

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

Ricardo Barbosa Felipini

**AVALIAÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA PARA O
CONTROLE DA SARNA DA MACIEIRA (*Venturia inaequalis*
Cke.) E DA CERCOSPORIOSE DA BETERRABA (*Cercospora*
beticola Sacc.)**

Florianópolis

2011

RICARDO BARBOSA FELIPINI

**AVALIAÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA PARA O
CONTROLE DA SARNA DA MACIEIRA (*Venturia inaequalis*
Cke.) E DA CERCOSPORIOSE DA BETERRABA (*Cercospora*
beticola Sacc.)**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo
Di Piero

Florianópolis

2011

*Dedico à minha mãe Vera, e minhas
queridas irmãs Débora, Eliza
Fernanda e Soraia.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e aos seus servidores docentes e técnico-administrativos por viabilizarem o curso de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Ao professor Robson Marcelo Di Piero, pela orientação, ensinamentos e incansável dedicação, a qual possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Marcelo Maraschin pelo auxílio no projeto envolvendo a sarna da macieira, e pelas excelentes aulas ministradas.

Aos pesquisadores José Itamar Boneti e Yoshinori Katsurayama à sua equipe, pelos experimentos desenvolvidos na EPAGRI de São Joaquim.

À Zamira pela amizade; ao Argus, Bruno, Carol e Valdenir, pelo auxílio em experimentos envolvendo beterraba; aos demais estudantes que estão ou já passaram pelo Laboratório, pela agradável convivência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Conídio de *Venturia inaequalis* em microscópio óptico com aumento de 1200x. Barra = 10 μm 9
- Figura 2. Representação esquemática do ciclo da sarna da macieira (BONETI et al., 1999) 10
- Figura 3. Ciclo da cercosporiose da beterraba. Adaptado de SBREB (2011)..... 16
- Figura 4. Sintomas de cercosporiose na folha de beterraba (A). Corte histológico transversal de uma lesão esporulante em aumento de 1200x (B). Barra =100 μm 17
- Figura 5. Estrutura química da quitina e da quitosana. Adaptado de No & Meyers (1997) 25
- Figura 6. Efeito de quitosana 5 mg.mL^{-1} ou fosfito de potássio 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ sobre a severidade da sarna em folhas de macieira no ano de 2010. As mudas foram tratadas com os produtos 7 dias antes da inoculação com *Venturia inaequalis*. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de SNK a 5% de probabilidade. Análise estatística a partir dos dados transformados para \sqrt{x} . Dados obtidos a partir da EPAGRI-São Joaquim 43
- Figura 7. Atividade de peroxidases (A) e β -1,3 glucanases (B) em folhas de macieira, suscetíveis (símbolos cheios) e resistentes (símbolos vazios) à sarna, pulverizadas com água destilada (\bullet, \circ); quitosana 5 mg.mL^{-1} ($\blacktriangle, \triangle$), fosfito de potássio 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (\blacklozenge, \lozenge) ou FASC (\blacksquare, \square), no ano de 2009. As mudas foram tratadas 7 dias antes da inoculação com *Venturia inaequalis*. Houve diferença significativa entre folhas suscetíveis e resistentes em A pelo teste de F a 1% de probabilidade. Análise estatística a partir dos dados transformados para Log x..... 44
- Figura 8. Atividade de peroxidases (A) e β -1,3 glucanases (B) em folhas de macieira, suscetíveis (símbolos cheios) e resistentes (símbolos vazios) à sarna, pulverizadas com água destilada (\bullet, \circ); quitosana 5 mg.mL^{-1} ($\blacktriangle, \triangle$) ou fosfito de potássio 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (\blacklozenge, \lozenge), no ano de 2010.

As mudas foram tratadas 7 dias antes da inoculação com *Venturia inaequalis*. Houve diferença significativa entre folhas suscetíveis e resistentes em A pelo teste de F a 1% de probabilidade45

Figura 9. Teor de flavonóides em folhas de macieira, suscetíveis e resistentes à sarna, 7 dias após o tratamento com água destilada, quitosana 5 mg.mL⁻¹ ou fosfito de potássio 2 µL.mL⁻¹, imediatamente antes da inoculação com *Venturia inaequalis*. Houve interação entre os fatores "tipo de folha" e "produto", pelo teste de F a 1 % de probabilidade. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de SNK a 5 % de probabilidade. Análise estatística a partir dos dados transformados para \sqrt{x} 46

Figura 10. Teor de compostos fenólicos totais em folhas de macieira, suscetíveis (símbolos cheios) e resistentes (símbolos vazios) à sarna, pulverizadas com água destilada (●,○); quitosana 5 mg.mL⁻¹ (▲,△) ou fosfito de potássio 2 µL.mL⁻¹ (◆,◇). As mudas foram pulverizadas 7 dias antes da inoculação com *Venturia inaequalis*. Não houve diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de F a 5% de probabilidade..46

Figura 11. Germinação de esporos de *Venturia inaequalis*, em diferentes doses de quitosana (A) ou de fosfito de potássio (B), após 48 horas de incubação em fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C±1 °C. Houve efeito de doses para quitosana e fosfito de potássio, pelo teste de F a 1 % de probabilidade.....47

Figura 12. Germinação de esporos de *Venturia inaequalis* na presença de água destilada (A), quitosana 500 µg.mL⁻¹ (B) ou fosfito de potássio a 5 µL.mL⁻¹ (C) após 48 horas de incubação em fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C±1. Observam-se tubos germinativos defeituosos dos esporos germinados em suspensão de quitosana. Barra = 10 µm. ...48

Figura 13. Esquema de amostragem para avaliação da severidade da cercosporiose e para a retirada de amostras foliares para as determinações de compostos químicos (experimento 1).....64

Figura 14. Esquema de amostragem para avaliação da severidade da cercosporiose e para a retirada de amostras foliares para as determinações de compostos químicos (experimento 2).....65

Figura 15. Crescimento micelial (A) e esporulação (B) de *Cercospora beticola* em meio de cultura batata-dextrose-água (BDA,●), V8-água (V8,■), extrato de levedura (EL,▲) ou extrato de folha-água (EF,x). Houve diferença no diâmetro das colônias crescidas nos diferentes meios de cultura. Barras seguidas da mesma letra em B não diferem entre si pelo teste de SNK a 1% de probabilidade..... 68

Figura 16. Severidade da cercosporiose em folhas de beterrabas pulverizadas com água, ácido clorídrico (HCl), quitosana ou acibenzolar-S-metílico (ASM) e, 24 horas depois, inoculadas com *Cercospora beticola*. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de SNK a 5 % de probabilidade 69

Figura 17. Severidade da cercosporiose em folhas de beterraba tratadas com ácido clorídrico 0,05N (HCl); quitosana (2 mg.mL⁻¹) ou acibenzolar-S-metílico a 25 mg.L⁻¹ (ASM) e, 3 dias depois, inoculadas com *Cercospora beticola*. Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de SNK a 5 % de probabilidade..... 70

Figura 18. Severidade da cercosporiose em folhas de beterraba tratadas com diferentes doses de quitosana e, 3 dias depois, inoculadas com *Cercospora beticola*. Houve efeito de doses de quitosana pelo teste de F a 1% de probabilidade..... 71

Figura 19. Severidade da cercosporiose em folhas de beterrabas tratadas com diferentes doses de acibenzolar-S-metílico (ASM) e, 3 dias depois, inoculadas com *Cercospora beticola*. Houve efeito de doses de quitosana pelo teste de F a 1% de probabilidade..... 71

Figura 20. Severidade da cercosporiose (A), teor de betalaínas (B), atividades de enzimas peroxidases (C) e β-1,3 glucanases (D), e teores de flavonóides (E) e compostos fenólicos totais (F), em folhas de beterraba pulverizadas com quitosana (1 mg.mL⁻¹) 3 d.a.i. ou ASM (50 mg.L⁻¹) 7 d.a.i. com *Cercospora beticola*. Barras seguidas pela mesma letra em A, e marcadores seguidos pela mesma letra em C e D dentro de cada tempo, não diferem entre si pelo teste de SNK a 5% de probabilidade..... 74

Figura 21. Severidade de cercosporiose (A), teor de betalaínas totais (B), atividades de enzimas peroxidases (C) e β -1,3 glucanases (D), em folhas de beterraba pulverizadas com quitosana (1 mg.mL^{-1}) ou ASM (50 mg.L^{-1}) aos 3 d.a.i. e aos 7 d.a.i. com *Cercospora beticola*. Barras seguidas pela mesma letra em A, e marcadores seguidos pela mesma letra em C e D dentro de cada tempo, não diferem entre si pelo teste de SNK a 5% de probabilidade.....76

Figura 22. Diâmetro de colônias de *Cercospora beticola* em meio de cultura BDA 20 dias depois da repicagem, crescidas na presença de diferentes concentrações de quitosana (A) ou acibenzolar-S-metílico – ASM (B). Houve efeito de doses tanto para quitosana quanto para ASM, pelo teste de F a 1% de probabilidade. Foto: Felipini (2011)77

Figura 23. Colônias de *Cercospora beticola* em meio de cultura BDA, na presença de diferentes concentrações de quitosana ou acibenzolar-S-metílico (ASM), aos 20 dias após a repicagem.....77

Figura 24. Diâmetro de colônias de *Cercospora beticola* em meio de cultura BDA, na presença de diferentes concentrações de quitosana ou ASM. Houve diferença entre os tratamentos pelo teste de F a 1 % de probabilidade.....78

Figura 25. Germinação de conídios e comprimento do tubo germinativo de *Cercospora beticola* após 8 horas na presença de diferentes concentrações de quitosana. Houve efeito de doses para as duas características avaliadas pelo teste de F a 1% de probabilidade79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito de quitosana, FPPRB, FASC, SBSC ou fosfito de potássio sobre a severidade da sarna em folhas de macieira no ano de 2009. As mudas foram tratadas aos 7 ou 3 dias antes da inoculação com <i>Venturia inaequalis</i> *	42
Tabela 2. Severidade (%) da cercosporiose em folhas de beterraba pulverizadas com água, quitosana (1 mg.mL^{-1}) ou acibenzolar-S-metílico (ASM 50 mg.L^{-1}), em diferentes intervalos de tempo antes da inoculação com <i>Cercospora beticola</i>	72
Tabela 3. Germinação de conídios e comprimento do tubo germinativo de <i>Cercospora beticola</i> após 8 horas na presença de diferentes concentrações de ASM	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE - Água destilada estéril
ASM - Acibenzolar-S-metílico
d.a.i. - Dias antes da inoculação
ERO - Espécie reativa de oxigênio
FAL - Fenilalanina amônia-liase
FASC - Filtrado da suspensão autoclavada de fermento à base de *Saccharomyces cerevisiae*
FPPRB - Fração polissacarídica do parênquima de reserva da babosa
IBE - Inibidores da biossíntese do ergosterol
pH - Potencial hidrogeniônico
Proteínas-RP - Proteínas relacionadas à patogênese
RSA - Resistência sistêmica adquirida
RSI - Resistência sistêmica induzida
SBSC - Suspensão bruta de fermento à base de *Saccharomyces cerevisiae*
SNK - Student Newman Keuls
Teste de F - Teste de Fisher

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvi
APRESENTAÇÃO.....	1
RESUMO.....	3
ABSTRACT	5
CAPÍTULO 1 - PATOSSISTEMAS ESTUDADOS E CONSIDERAÇÕES SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	7
1.1. MACIEIRA	7
1.1.1. Origem botânica da macieira e seu cultivo	7
1.1.2. Sarna da macieira	8
1.2 BETERRABA	13
1.2.1. Origem botânica da beterraba e seu cultivo	13
1.2.2. Cercosporiose da beterraba	15
1.3. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	18
1.3.1. Produtos potencialmente elicitores de resistência em plantas	21
1.3.1.1. Fosfitos	21
1.3.1.2. Quitosana	24
1.3.1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
1.3.1.4. Babosa	28
1.3.1.5. Acibenzolar-S-metílico.....	30
CAPÍTULO 2 – FOSFITO DE POTÁSSIO, QUITOSANA, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen E POLISSACARÍDEOS DE FOLHAS DE BABOSA (<i>Aloe barbadensis</i> Miller), PARA O CONTROLE DA SARNA DA MACIEIRA (<i>Venturia inaequalis</i> Cooke).....	33
2.1. INTRODUÇÃO.....	33
2.2. OBJETIVOS.....	35
2.2.1. Objetivo geral.....	35
2.2.2. Objetivos específicos	35
2.3. HIPÓTESES	35
2.4. METODOLOGIA	36
2.4.1. Obtenção e preparo dos produtos.....	36
2.4.2. Efeito dos produtos sobre a severidade da sarna da macieira e amostragem para realização de testes bioquímicos ..	36
2.4.3. Ativação de mecanismos de defesa em folhas de maçã	38

2.4.3.1. Determinação das atividades de peroxidases e β -1,3 glucanases.....	39
2.4.3.2. Flavonóides	40
2.4.3.3. Compostos fenólicos totais.....	40
2.4.4. Efeito dos produtos sobre a germinação de esporos de <i>Venturia inaequalis</i>	41
2.4.5. Delineamento experimental e análise estatística.....	41
2.5. RESULTADOS.....	42
2.5.1. Efeito protetor sobre a sarna da macieira.....	42
2.5.2. Efeito dos produtos na ativação dos mecanismos bioquímicos da planta.....	43
2.5.3. Germinação de esporos de <i>Venturia inaequalis</i>	47
2.6. DISCUSSÃO.....	48
CAPÍTULO 3 – QUITOSANA E ACIBENZOLAR-S-METÍLICO NO CONTROLE DA CERCOSPORIOSE DA BETERRABA E SUAS ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DA PLANTA.....	57
3.1. INTRODUÇÃO	57
3.2. OBJETIVOS	59
3.2.1. Objetivo geral	59
3.2.2. Objetivos específicos	59
3.3. HIPÓTESES.....	59
3.4. METODOLOGIA	60
3.4.1. Isolamento de <i>Cercospora beticola</i>	60
3.4.2. Esporulação <i>in vitro</i> de <i>Cercospora beticola</i>	61
3.4.3. Obtenção e preparo dos produtos.....	61
3.4.4. Cultivo e tratamento das plantas, inoculação e avaliação da severidade da doença	62
3.4.5. Testes preliminares de proteção de plantas de beterraba ..	62
3.4.6. Efeito de diferentes doses de quitosana e ASM para o controle da cercosporiose.....	63
3.4.7. Efeito do intervalo de tempo entre tratamento e inoculação sobre a cercosporiose.....	63
3.4.8. Avaliação dos mecanismos de ação bioquímicos da quitosana e do ASM no controle da cercosporiose da beterraba ..	63
3.4.8.1. Peroxidases, β -1,3-glucanases e proteínas totais	65
3.4.8.2. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais	65
3.4.8.3. Determinação do conteúdo de flavonóides.....	65
3.4.8.4. Betalaínas	66

3.4.9. Diâmetro de colônias de <i>Cercospora beticola</i> crescidas em presença de quitosana ou acibenzolar-S-metílico	66
3.4.10. Germinação de esporos de <i>Cercospora beticola</i>	67
3.5. RESULTADOS	67
3.5.1. Crescimento micelial e esporulação <i>in vitro</i> de <i>Cercospora beticola</i>	67
3.5.2. Testes preliminares de proteção de plantas de beterraba ..	68
3.5.3. Efeito de diferentes doses de quitosana e ASM para o controle da cercosporiose.....	70
3.5.4. Efeito do intervalo de tempo entre tratamento e inoculação sobre a cercosporiose.....	72
3.5.5. Avaliação dos mecanismos de ação bioquímicos da quitosana e do ASM no controle da cercosporiose da beterraba.	72
3.5.6. Diâmetro de colônias e germinação de esporos de <i>Cercospora beticola</i> na presença de quitosana ou acibenzolar-S-metílico	76
3.6. DISCUSSÃO.....	80
CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS.....	87
APÊNDICES	109

APRESENTAÇÃO

A busca por novos métodos de controle de doenças de plantas tem motivado o desenvolvimento de estudos que visam evitar danos causados por fitopatógenos e ao mesmo tempo apresentem baixo impacto sobre o homem e o ambiente. Uma das alternativas promissoras é a utilização de moléculas que são capazes de ativar mecanismos de defesa em plantas, em um processo conhecido como indução de resistência.

Há grande diversidade de produtos na literatura que estão sendo testados, como extratos de plantas medicinais, polissacarídeos de origem vegetal e animal, microrganismos e compostos químicos.

Neste estudo, buscou-se avaliar produtos potencialmente elicitores de mecanismos de defesa em plantas no controle da sarna da macieira e da cercosporiose da beterraba e identificar possíveis mecanismos de ação envolvidos.

O trabalho está dividido em três capítulos. O primeiro aborda aspectos gerais relacionados aos patossistemas estudados (macieira-sarna e beterraba-cercospora), informando também os princípios da indução de resistência e os potenciais elicitores que foram testados.

O segundo capítulo trata especificamente dos experimentos envolvendo a sarna da macieira, onde foram testados polissacarídeos derivados da carapaça de crustáceos (quitosana) e de folhas de babosa (*Aloe vera*), fermento biológico à base da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e adubo foliar fosfito de potássio. Nesse capítulo informa-se a metodologia utilizada, os resultados obtidos e a discussão dos resultados. O terceiro capítulo foi concebido nos mesmos moldes do anterior, porém abordando a cercosporiose da beterraba em plantas tratadas com quitosana ou o indutor de resistência acibenzolar-S-metílico.

Assim, buscou-se contribuir para a geração de alternativas para a redução das doenças de plantas, e elucidar de que forma os produtos estariam atuando nesse controle.

**AVALIAÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA PARA O
CONTROLE DA SARNA DA MACIEIRA (*Venturia inaequalis*
Cke.) E DA CERCOSPORIOSE DA BETERRABA (*Cercospora*
beticola Sacc.)**

RESUMO

As doenças foliares podem causar importantes danos às plantas cultivadas, como a cercosporiose da beterraba (*Cercospora beticola* Sacc.) e a sarna da macieira (*Venturia inaequalis* Cke.). Neste trabalho, diferentes elicitores de defesa em plantas foram testados para o controle dessas doenças, buscando-se identificar mecanismos de ação envolvidos. Para isso, foram conduzidos ensaios em casa de vegetação e *in vitro*. No patossistema macieira-sarna, foram avaliados fosfito de potássio, quitosana, suspensão bruta de fermento à base de *Saccharomyces cerevisiae* (SBSC), filtrado da suspensão autoclavada de fermento à base de *Saccharomyces cerevisiae* (FASC) e suspensão da fração polissacarídica do parênquima de reserva de folhas de babosa (FPPRB) pulverizados em plantas de macieira, cv. Gala aos 3 ou 7 dias antes da inoculação do patógeno (d.a.i.). Amostras de plantas tratadas com alguns desses produtos foram coletadas para a determinação das atividades enzimáticas de peroxidases e β -1,3 glucanases, e dos teores de flavonóides e compostos fenólicos totais. Constatou-se que o fosfito de potássio ($2 \mu\text{L.mL}^{-1}$) reduziu a severidade da sarna nas mudas de macieira, em média de 73%. Em relação aos parâmetros bioquímicos, a aplicação de fosfito 7 d.a.i. reduziu o teor de flavonóides nas folhas suscetíveis à sarna, no momento da inoculação, enquanto a quitosana reduziu esse teor nas folhas resistentes à doença. Em geral, folhas suscetíveis à sarna apresentaram maior teor de flavonóides do que as resistentes. O teor de compostos fenólicos totais não foi alterado pela aplicação de fosfito ou quitosana, e foi similar entre folhas suscetíveis e resistentes à doença. Quanto à atividade enzimática, não houve diferença entre as plantas que receberam os produtos, porém as folhas resistentes à sarna apresentaram maior atividade de peroxidases em dois experimentos distintos. Apesar de apenas o fosfito ter reduzido a severidade da doença, ambos fosfito e quitosana reduziram a germinação de esporos do fungo *in vitro*. No caso do patossistema beterraba-cercosporiose, quitosana e o indutor de resistência acibenzolar-S-metílico (ASM) foram testados preventivamente, em diferentes doses e intervalos de tempo entre tratamento e inoculação.

Em alguns bioensaios foram coletadas amostras de folhas para quantificar a atividade de peroxidases e β -1,3 glucanases e também o teor de flavonóides, compostos fenólicos totais e betalainas totais. A severidade da doença foi avaliada nas três folhas mais velhas 20 dias após a inoculação com o auxílio do programa computacional Quant v.1.0.2.. Ainda, foram conduzidos testes em lâminas de microscopia escavadas para verificar a germinação de esporos de *C. beticola* na presença de diferentes doses dos produtos testados. Quitosana e ASM reduziram a severidade da cercosporiose em folhas de beterraba, proporcionando maior efeito quando pulverizados 3 d.a.i. (1 mg.mL⁻¹) para quitosana, e 7 d.a.i (50 mg.L⁻¹) para o ASM. O polissacarídeo afetou diretamente o patógeno, inibindo significativamente o crescimento micelial e a germinação de esporos. Plantas que receberam uma aplicação de quitosana apresentaram maior atividade de enzimas oxidativas 3 dias depois, imediatamente antes da inoculação do patógeno. Em plantas tratadas por duas vezes com o polissacarídeo, as atividades de peroxidases e β -1,3 glucanases foram maiores em relação à testemunha, antes e depois da inoculação. Esses resultados indicam que o controle da cercosporiose exercido pela quitosana pode ter sido tanto por seu efeito direto sobre o patógeno, como pela ativação de proteínas-RP. O ASM, por sua vez, apresentou pequeno efeito antimicrobiano contra *C. beticola*, mas promoveu os maiores aumentos nas atividades de peroxidases e β -1,3 glucanases, indicando-se que o seu efeito na redução da severidade da doença esteja relacionado principalmente à ativação de mecanismos de defesa. Desta forma, a aplicação preventiva de fosfito de potássio é uma opção para o controle da sarna da macieira, enquanto que quitosana e o ASM podem auxiliar no manejo da cercosporiose da beterraba.

Palavras-chave: indução de resistência, proteínas relacionadas à patogênese, flavonóides, compostos fenólicos totais, betalainas.

EVALUATION OF RESISTANCE INDUCTORS FOR CONTROL OF APPLE SCAB (*Venturia inaequalis* Cke.) AND CERCOSPORA LEAF SPOT (*Cercospora beticola* Sacc.) IN BEETS

ABSTRACT

The foliar diseases such as Cercospora leaf spot (*Cercospora beticola* Sacc.) in beets and apple scab (*Venturia inaequalis* Cke.) can cause significant damage to crops. In this work, potential elicitors of plant defenses were evaluated for the control of these diseases. For this, trials were conducted inside the greenhouse and *in vitro* conditions. In the apple-scab pathosystem, potassium phosphite, chitosan, the crude suspension of commercial *Saccharomyces cerevisiae* (SBSC), the filtrate of *S. cerevisiae* obtained from autoclaved commercial yeast (FASC) and the suspension of polysaccharide from *Aloe* leaves (FPPRB) were sprayed on apple plants, cv. Gala, at 3 or 7 days before pathogen inoculation. Leaf samples from plants treated with some of these products were collected to determine the enzymatic activity of peroxidase and β -1,3 glucanases, and levels of phenolic compounds and flavonoids. Potassium phosphite ($2 \mu\text{L.mL}^{-1}$) reduced the severity of apple scab on seedlings, by around 73%. Regarding biochemical parameters, the application of phosphite 7 d.a.i. reduced the content of flavonoids in the scab susceptible leaves, at the time of inoculation, while the polysaccharide chitosan reduced the flavonoid content in the resistant leaves. Overall, scab susceptible leaves had higher content of flavonoids than resistant leaves. The content of phenolic compounds was not altered by application of phosphite or chitosan, and it was similar between susceptible and resistant leaves. There was not difference in the enzymatic activities among plants that received the different products, but the scab resistant leaves had higher peroxidase activity in two distinct experiments. Only the phosphite reduced the severity of the disease, but both phosphite and chitosan reduced the germination of *V. inaequalis* spores. In the case of Cercospora leaf spot, chitosan and the plant activator acibenzolar-S-methyl (ASM) were evaluated preventively at different doses and intervals between treatment and inoculation. In some bioassays leaf samples were collected to quantify the peroxidase and β -1,3 glucanase activities as well to determine the flavonoid, phenolic compound and betalain contents. Disease severity was assessed in the three oldest leaves 20 days after inoculation with the aid of software Quant v.1.0.2.. In addition, tests were conducted in glass slides to check the spore germination of *C. beticola* in the presence of

different doses of the products. The polysaccharide chitosan and plant activator ASM reduced the severity of *Cercospora* leaf spot, and the effect was better when chitosan was sprayed 3 d.a.i. (1 mg.mL^{-1}), or when ASM was sprayed 7 d.a.i. (50 mg.L^{-1}). The polysaccharide affected the pathogen directly, both on the mycelial growth and spore germination. Plants that received an application of chitosan had higher oxidative enzyme activity 3 days later, just before the inoculation. In plants treated with chitosan twice, the peroxidase and β -1,3 glucanase activities were higher compared to the control, before and after the inoculation. These results indicate that the control of *Cercospora* leaf spot by chitosan has occurred by antibiosis and by the activation of PR-proteins. In turn, ASM had a little effect against *C. beticola*, but it promoted the highest levels in peroxidase and β -1,3 glucanase activities, indicating that its effect in reducing the severity of the disease is mainly related to the activation of defense mechanisms. Thus, the preventive application of potassium phosphite is an option for control of apple scab, while chitosan and ASM can help in the management of *Cercospora* leaf spot.

Keywords: induced resistance, pathogenesis-related proteins, flavonoids, phenolic compounds, betalains.

CAPÍTULO 1 - PATOSSISTEMAS ESTUDADOS E CONSIDERAÇÕES SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

1.1. MACIEIRA

1.1.1. Origem botânica da macieira e seu cultivo

O provável centro de origem da macieira é a região do Cáucaso, local montanhoso da Ásia, entre o Mar Negro, Cáspio e o leste da China, em uma altitude de cerca de 2.000 metros. Supõe-se que sua evolução tenha iniciado há cerca de 25 milhões de anos e o início do seu cultivo tenha ocorrido na Grécia há 2200 anos. Existem mais de 7.000 variedades de maçãs conhecidas, porém aproximadamente 40 apresentam importância econômica (BLEICHER, 2002).

A família Rosaceae é uma das maiores famílias de Angiospermas, abrangendo aproximadamente 100 gêneros e 3000 espécies. No Brasil, há nove gêneros e 25 espécies nativas descritas, com destaque para o gênero *Rubus* sp., cujos frutos são conhecidos popularmente como amoras-silvestres, porém as principais espécies cultivadas são originárias do hemisfério norte, como o pêssego (*Prunus persica*) nativo da China, o morango silvestre europeu (*Fragaria vesca*) e posteriormente seus híbridos, a pêra (*Pyrus communis*) e a maçã (*Malus domestica*) oriundos da região mediterrânea (SOUZA & LORENZI, 2005).

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é uma frutífera lenhosa de clima temperado. Trata-se de uma espécie decídua, pertencente à subfamília Pomoideae. As flores brancas ou rosas são agrupadas em uma inflorescência chamada de umbela, formada sobre um profundo receptáculo floral em forma de taça. A polinização é preferencialmente entomófila, e por tratar-se de uma espécie alógama, a fecundação do óvulo depende da transferência de pólen de uma planta para o estigma de outra. A partir do desenvolvimento do receptáculo floral que envolve os ovários, tem-se a formação do fruto, denominado pomo (IUCHI, 2002), o qual é o produto comercializado da cultura.

A cultura da macieira em Santa Catarina foi impulsionada a partir da década de 1970, influenciada por uma política de incentivos fiscais visando aumentar a produção e diminuir as importações de maçãs. Nesse contexto, o estado se tornou o maior produtor deste fruto do país (NACHTIGALL, 2004).

Em âmbito internacional, o Brasil hoje é o 12º produtor de maçãs no mundo com uma área colhida de 38.128 ha, e produtividade média de 34.547 kg.ha⁻¹, porém, na América do Sul se encontra atrás de países como Chile e Argentina. No país, em virtude das condições climáticas necessárias ao seu cultivo, a produção da fruta está concentrada nos estados do sul, principalmente Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sendo este último responsável por mais de 51% da produção nacional, equivalente a 680 mil toneladas na safra de 2009-2010. Mais de 90% desse total é representado pelas cultivares Fuji e Gala (VIEIRA, 2010).

A cultivar Gala, originária da Nova Zelândia, adapta-se bem em altitudes superiores a 1300 metros. Trata-se de uma cultivar precoce, produzindo entre a segunda quinzena de janeiro e a segunda quinzena de fevereiro, de maneira desuniforme, necessitando vários repasses. Os frutos apresentam epiderme vermelho-rajada sobre fundo amarelo, lisa, brilhante, sendo a coloração mais intensa em locais mais expostos ao sol, podendo ser armazenados em câmara fria convencional por até três meses, ou até cinco meses quando em atmosfera controlada, perdendo o sabor e a textura quando mantidos além destes períodos (CAMILO; DENARDI, 2002).

Apesar do incremento de produtividade nos últimos anos, alguns fatores ainda limitam o aumento dos rendimentos, como as doenças causadas por fungos e bactérias. A principal doença hoje da cultura é a sarna da macieira, uma doença fúngica que pode incidir sobre as folhas e frutos nas duas principais cultivares plantadas no estado, Gala e Fuji.

1.1.2. Sarna da macieira

A sarna da macieira é uma doença fúngica que pode incidir sobre a parte aérea da planta, incluindo flores, pedicelos, frutos, brotações jovens e folhas. O agente etiológico da doença é o fungo filamentoso *Venturia inaequalis* Cke., pertencente à família Venturiaceae da classe dos ascomicetos. Sua fase assexual é denominada de *Spiloceae pomi* Fr. (VALDEBENITO-SANHUEZA & BETTI, 2005).

O fungo *V. inaequalis* produz uma estrutura reprodutiva denominada pseudotécio. Esse tem formato globoso e mede entre 90 e 160 µm de diâmetro, dentro do qual são formadas entre 50 e 100 ascas, medindo de 55 a 75 µm por 6 a 12 µm. Dentro de cada asca são formados oito ascósporos. Os ascósporos têm entre 11 e 15 µm por 5 a 7

μm , são septados e hialinos quando jovens, e assumem uma coloração castanho-clara à medida que amadurecem. Cada ascósporo possui duas células, sendo uma extremidade com formato cônico e a outra arredondada (BONETI et al., 2002).

A fase anamorfa, *S. pomi*, possui micélio hialino quando jovem, o qual vai escurecendo com o passar do tempo, formando um estroma subcuticular ou intraepidermal, a partir do qual são formados conidióforos curtos, medindo entre 5 e 6 μm , entumecidos na base, eretos, de cor castanha, com comprimento médio de 90 μm . Na ponta de cada conidióforo é formado apenas um conídio (12 a 30 μm por 6 a 10 μm), de coloração castanha, liso, bicelulado e de formato oval (SIVANSEN, 1977; MELZER & BERTON, 1989; BONETI et al. 2002) (Figura 1).



Figura 1. Conídio de *Venturia inaequalis* em microscópio óptico com aumento de 1200x. Barra = 10 μm .

Tendo como base a queda das folhas da macieira no solo a partir do outono, por se tratar de uma espécie caducifólia, tem-se o início da reprodução sexuada do patógeno, com a formação de pseudotécios e, conseqüentemente, de ascas e áscosporos (Figura 2). Isso ocorre nos períodos de outono e inverno, sendo a temperatura de 4 °C ideal para a formação do corpo de frutificação do fungo. A maturação dos ascósporos inicia-se na primavera, entre temperaturas de 16 °C a 18 °C (BONETI et al., 2002).

Os ascósporos são liberados principalmente depois de períodos chuvosos, sendo a máxima descarga observada de 3 a 6 horas após o início da chuva. No município de São Joaquim, SC, esse processo começa no mês de agosto, antes do início da brotação da macieira, tendo seu clímax nos meses de setembro e outubro, durante a floração, cessando no mês de novembro (BONETI & KATSURAYAMA, 1988). Eles são ejetados a partir dos pseudotécios, através de uma abertura em sua superfície denominada ostíolo, e posteriormente são carregados por correntes de ar (GILPATRICK et al., 1971).

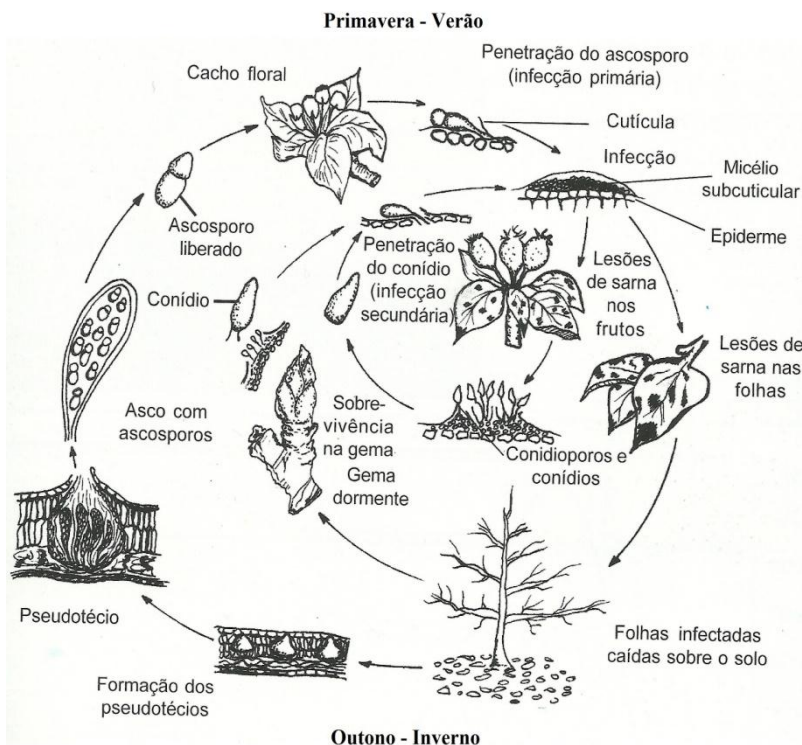


Figura 2. Representação esquemática do ciclo da sarna da macieira (BONETI et al., 1999).

Após os ascósporos se depositarem sobre as folhas, inicia-se o processo de germinação. Keith (1926) demonstrou que a ocorrência da sarna da macieira é relacionada à temperatura e ao período de

molhamento foliar. Posteriormente, Mills (1944) construiu uma tabela apresentando as relações entre temperatura e período de molhamento foliar o período de incubação e a severidade durante o processo de infecção primária da sarna, e demonstrou que temperaturas amenas de até 25,6 °C e longos períodos de molhamento foliar favorecem o desenvolvimento da doença.

Após o tubo germinativo, o fungo forma um apressório, o qual auxilia a penetração direta através da cutícula e da parede externa das células da epiderme, sendo que os sintomas se desenvolvem depois de 9 a 17 dias da infecção. Nas folhas, as lesões surgem como pequenas manchas de cor verde-oliva de formato circular, que se tornam acinzentadas. Com o tempo, as lesões podem coalescer, espalhando-se por toda a superfície foliar. Infecções severas podem afetar o pecíolo, causando a queda precoce da folha (VALDEBENITO-SANHUEZA & BETTI, 2005). As folhas mais jovens, que ainda não estão expandidas, são as mais suscetíveis. À medida que a folha envelhece, o período de incubação aumenta e a densidade das lesões torna-se menor, devido ao crescimento da folha. Esse fenômeno é conhecido como resistência ontogênica (LI & XU, 2002).

Nas lesões formadas, são produzidos os conídios referentes à fase anamórfica, os quais são responsáveis pelos ciclos de infecção secundários (Figura 2). Esses são formados em conidióforos, a partir dos quais são disseminados por respingos de água e por correntes de ar, e quando atingem partes suscetíveis da planta iniciam o processo de infecção de forma semelhante aos ascósporos (BONETI, et al., 2002).

Quando a doença atinge frutos pequenos, pode provocar rachadura, deformação e queda prematura, enquanto que quando incide sobre frutos em fase de maturação, forma lesões de 2 a 3 mm, circulares e de coloração escura, que continuam a se desenvolver no pós-colheita, diminuindo o seu valor comercial (VALDEBENITO-SANHUEZA & BETTI, 2005).

A severidade da doença é relacionada à pressão inicial de inóculo, à suscetibilidade da cultivar e às condições de temperatura e umidade, sendo que regiões onde a primavera e o verão apresentam temperatura amena e alta umidade, como ocorre no Planalto Catarinense, são favoráveis ao desenvolvimento da doença (BONETI, et al., 2002).

Uma das formas de controle da sarna que tem se buscado é o desenvolvimento de cultivares resistentes ao patógeno. Entre as cultivares disponíveis no momento, encontram-se a EPAGRI-402 Catarina, Joaquina, Primícia, Duquesa e Fred Hough, porém ainda

pouco cultivadas. Todas são portadoras do gene de resistência *Vf*, introduzido a partir do clone 821 da macieira ornamental *Malus floribunda* (SCHENATO et al. 2008).

As cultivares resistentes à sarna da macieira portadoras do gene *Vf*, no entanto, já tiveram sua resistência quebrada pelo aparecimento de outras raças fisiológicas do patógeno (PARISI et al., 1990). Atualmente, há 8 raças fisiológicas de *V. inaequalis* descritas, identificadas a partir de sua patogenicidade em cultivares diferenciadoras, porém no Brasil, até o momento, foi identificada apenas a raça 1, a qual é patogênica às duas principais cultivares plantadas no país, Fuji e Gala. Esse fato pode estar relacionado à baixa pressão de seleção do patógeno para o surgimento de novas raças fisiológicas devido à homogeneidade genética dos cultivos (SCHENATO et al. 2008). No Brasil, têm-se buscado também fontes de resistência em variedades de macieiras antigas, mantidas por agricultores no interior do Rio Grande do Sul (VALDEBENITO-SANHUEZA & OLIVEIRA, 2006).

Apesar dos esforços para a busca de fontes de resistência e o desenvolvimento de cultivares, o manejo da sarna da macieira está baseado no controle químico. Atualmente, no Ministério da Agricultura (MAPA, 2011), há 68 produtos comerciais registrados para o controle da doença, incluindo fungicidas protetores, curativos e erradicantes.

Historicamente, no início da década de 1970, o controle da sarna era realizado, principalmente, pela aplicação de fungicidas protetores, cuja eficiência no controle da doença variava em função das condições meteorológicas. A introdução de fungicidas do grupo dos benzimidazóis, com ação protetora, curativa e erradicante, aumentou satisfatoriamente o controle da doença, porém após os primeiros 4 anos de uso, houve total perda de eficiência devido à seleção de populações do patógeno resistentes (AKUTSU & TANAKA, 1977).

A partir da década de 1980, com a introdução de fungicidas Inibidores da Biossíntese de Esgosterol (IBEs), associados à adaptação da tabela de Mills para as condições brasileiras, iniciou-se uma nova fase no controle da sarna (BERTON & MELZER, 1983, 1984). Os IBEs são fungicidas pertencentes ao grupo dos triazóis, os quais evitam a biossíntese do ergosterol, substância necessária a alguns fungos, como *V. inaequalis*, para a formação da membrana plasmática. São fungicidas sistêmicos, que podem ser aplicados até 96 horas após o início de períodos favoráveis à infecção, pois possuem ação curativa, ou seja, atuam mesmo após o início do processo infeccioso, sendo que se houver

desenvolvimento de sintomas, a formação de esporos é reduzida ou inviabilizada (BONETI et al. 2002).

Nos dias atuais, o que se tem preconizado é a utilização de fungicidas com ação protetora, curativa e erradicante, associada a práticas culturais, que diminuam a concentração de inóculo inicial, como a eliminação de folhas sintomáticas após a queda, resultando assim em menor formação de pseudotécios, ou mesmo a poda das plantas para melhorar a ventilação da copa e facilitar o contato com os produtos aplicados. A estratégia para evitar a "quebra" de sensibilidade do patógeno é a utilização dos IBEs em mistura com produtos protetores, aplicando-os preventivamente (VALDEBENITO-SANHUEZA & BETTI, 2005).

No entanto, de maneira semelhante ao que ocorreu com os benzimidazóis na década de 70, a efetividade dos IBEs para o controle da sarna está diminuindo gradativamente. Experimento realizado em São Joaquim no ano de 2008 demonstrou que o controle da sarna pela aplicação de IBEs foi entre 10% e 34%. A pulverização com fungicidas protetores ainda resulta em um bom nível de controle, porém por não haver absorção e translocação na planta, pulverizações frequentes são necessárias, em virtude do surgimento de novas folhas a cada 5 dias, em média, nas condições de São Joaquim (BONETI & KATSURAYAMA, 2010).

Tendo em vista a necessidade de novas formas de controle da doença, outros produtos têm sido pesquisados para o controle da sarna, como os sais de fosfitos, leveduras e polissacarídeos de origem animal e vegetal (BONETI & KATSURAYAMA, 2002; HRAZDINA, 2003; BENGTSSON et al. 2009). Alguns desses apresentam um modo de ação diferente dos fungicidas convencionais, ativando mecanismos de defesa na planta, a qual passa a ser mais resistente às doenças causadas por microrganismos.

1.2 BETERRABA

1.2.1. Origem botânica da beterraba e seu cultivo

O provável centro de origem da espécie *Beta. vulgaris* L. é a região de clima temperado entre o norte da África e o sul da Europa (FILGUEIRA, 2003). Trata-se de uma herbácea por vezes encontrada na família Chenopodiaceae (NRSC/USDA, 2011), e mais recentemente em Amarantaceae (APG II, 2011). Algumas variedades pertencentes à

subespécie *B. vulgaris* subsp. *vulgaris* são cultivadas com a finalidade de produção de alimentos, como a acelga, a beterraba açucareira e a beterraba de mesa.

A planta é bianual, com folhas cordiformes, medindo entre 5-20 cm de comprimento. As flores são verdes ou vermelhas, com cinco pétalas, medem entre 3 e 5 mm, e se agrupam em uma densa espiga. Após a polinização, realizada principalmente pelo vento, formam-se os glomérulos, estruturas de consistência corticosa, medindo cerca de 4 mm de diâmetro, dentro das quais se encontram, em média, quatro sementes botânicas. A beterraba de mesa é desenvolvida a partir de uma típica parte tuberosa formada pelo entumescimento do hipocótilo. Tem coloração purpúrea, em decorrência do acúmulo de pigmentos denominados betalaínas, o que ocorre também nas folhas, nervuras e pecíolos. A raiz apresenta formato globular, sabor adocicado, e se desenvolve quase à superfície do solo (FILGUEIRA, 2003).

Existem no mercado diversas cultivares de beterrabas de mesa, com destaque para Katrina, Chata do Egito e Maravilha, todas suscetíveis à cercosporiose. A cultivar Maravilha produz bem em temperaturas entre 10 °C e 29 °C. Pode ser plantada através de semeadura direta, ou através de mudas cultivadas previamente em bandejas. A colheita no inverno inicia aproximadamente 80 dias após a semeadura ou o transplântio (GUIMARÃES, 2002; ISLA, 2010).

Dentro de *B. vulgaris* subsp. *vulgaris*, a beterraba de mesa é a mais cultivada no Brasil, ocupando a 13ª posição no ranking de cultivo de hortaliças (MARIMOTO, 1999). O cultivo da beterraba de mesa adapta-se melhor em locais de clima ameno, sendo que no Brasil ocorre principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, e na região Sul, sendo nessa última passível de cultivo o ano inteiro (CAMARGO, 1981). No ano de 2007, o comércio de sementes de beterraba movimentou mais de 5,6 milhões de reais, destinadas ao cultivo de uma área estimada em mais de 20.000 ha (ABCSEM, 2011).

No ano de 2009, dados divulgados pela Central de Abastecimento do Estado de Santa Catarina (CEASA) demonstraram que foram comercializados mais de 3 mil toneladas de beterraba de mesa, sendo que cerca de 73% desse total foi produzido em Santa Catarina, e o restante importado de outros estados, com destaque para o Rio Grande do Sul, de onde vieram 20% da beterraba comercializada (OSÓRIO, 2010). No primeiro semestre de 2010, na CEASA foram comercializadas mais de 2.361 toneladas de beterraba de mesa, movimentando um valor superior a 2,8 milhões de reais no atacado. Os

principais centros produtores em Santa Catarina são os municípios de Águas Mornas, Antônio Carlos e Urubici (ICEPA, 2011).

A cultura da beterraba não apresenta muitos problemas fitossanitários, porém a cercosporiose causada por *Cercospora beticola* é especialmente danosa à cultura, uma vez que a maioria das cultivares disponíveis são suscetíveis à doença, a qual pode causar perdas de produção caso medidas de controle não sejam adotadas.

1.2.2. Cercosporiose da beterraba

A cercosporiose, ou mancha de cercospora, é uma doença causada pelo fungo *Cercospora beticola* Sacc.. Trata-se da doença mais destrutiva da cultura da beterraba, tanto açucareira quanto a de mesa (FILGUEIRA, 2003).

Os fungos do gênero *Cercospora* Fres. (Reino Fungi, Subdivisão Deuteromycotina, Classe Hyphomycetes, Ordem Hyphales), apresentam conidióforos escuros, simples, provenientes de agregados que irrompem o tecido da folha, sobre os quais crescem os conídios, hialinos, filiformes e multicelulados. São principalmente parasitas de plantas superiores, causando doenças foliares como cretamento foliar de *Cercospora* em soja (*C. kikuchii*), mancha olho de rã em fumo (*C. nicotianae*) e cercosporiose em milho (*C. zea-maydis*) (BARNETT & HUNTER, 1972; WEILAND & KOCH, 2004).

A espécie *Cercospora beticola* foi primeiramente descrita por Saccardo em 1876 causando manchas foliares em beterraba açucareira (CARUEL, 1876). A fase sexual de *C. beticola* é desconhecida. Estudos moleculares comparando características genéticas dessa espécie com outras do mesmo gênero que apresentam fase teleomófica conhecida, sugerem que essas espécies possuem ancestralidade distintas e que a função sexual se perdeu durante o processo evolutivo (GOODWIN et al., 2001).

Os conidióforos e os conídios são produzidos nas lesões da doença na planta. Os primeiros têm coloração marrom-clara, e sobre esses formam-se os conídios hialinos, densamente septados e de formato aciculado, os quais medem entre 2,5-4 µm de largura e 50-200 µm de comprimento (WEILAND & KOCH, 2004; AGRIOS, 2005).

Os conídios do patógeno são dispersos através do vento e de gotículas de água, que ao se depositarem sobre a planta, e em condições ambientais favoráveis, germinam, emitindo tubo germinativo o qual

penetra a partir do estômato (Figura 3). Inicialmente, a colonização do tecido acontece de maneira assintomática (WEILAND & KOCH, 2004).

O fungo *C. beticola* é considerado um patógeno necrotrófico, o qual causa destruição do protoplasto para a obtenção dos nutrientes da célula. Apesar de penetrar através de estômatos, a produção de enzimas celulasas e pectinasas pode estar envolvida durante o processo de colonização vegetal (PAL & MUKHOPADHYAY, 1984). Na membrana plasmática vegetal, pode haver a ação de fitotoxinas que auxiliam no processo infeccioso. A cercosporina é uma fitotoxina que quando incidida pela luz é convertida à sua forma energeticamente ativa, podendo reagir com oxigênio molecular e produzir espécies reativas de oxigênio, as quais destroem as membranas celulares do hospedeiro. Assim, o patógeno tem acesso aos nutrientes que estavam dentro das células, porém para se proteger da ação das EROs, o fungo necessita produzir piridoxina (vitamina B6) (DAUB & EHRENSHAFT, 2000; AGRIOS, 2005). Outras fitotoxinas envolvidas no processo são as beticolinas, uma família de moléculas policíclicas não peptídicas, que atuam na formação de canais de íons na membrana bilipídica da célula do vegetal (GOUDET et al., 2000).

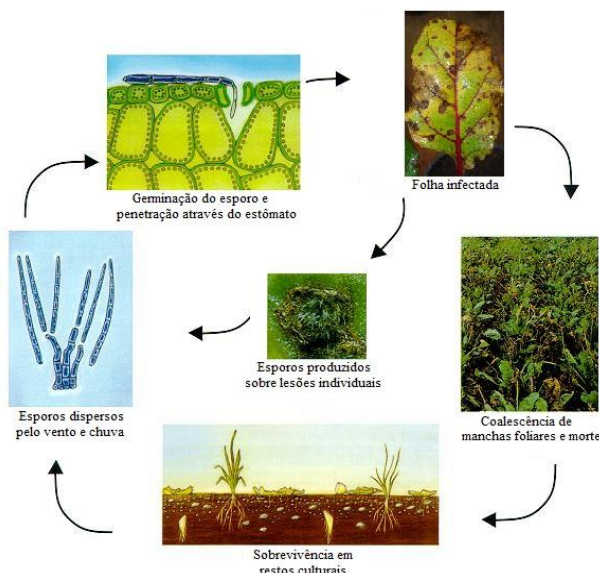


Figura 3. Ciclo da cercosporiose da beterraba. Adaptado de SBREB (2011).

O início da infecção causada por *C.beticola* é assintomático. Steinkamp et al. (1979) observaram microscopicamente a degeneração do protoplasma vegetal próximo ao local de infecção do patógeno apenas uma semana depois da inoculação. As lesões de cercosporiose são formadas a partir do colapso simultâneo de células do hospedeiro, formando uma lesão necrótica de alguns milímetros de diâmetro.

Em beterraba, o fungo infecta folhas e pecíolos, causando manchas delimitadas por um bordo avermelhado, com centro necrosado e de coloração cinzenta (Figura 4A) onde, à medida que crescem, ficam as estruturas do patógeno (Figura 4B). O aumento do número de lesões e o aumento da área, juntamente com o acúmulo de fitotoxinas, induzem à completa senescência da folha. Folhas mais velhas são mais suscetíveis à doença (WEILAND & KOCH, 2004).

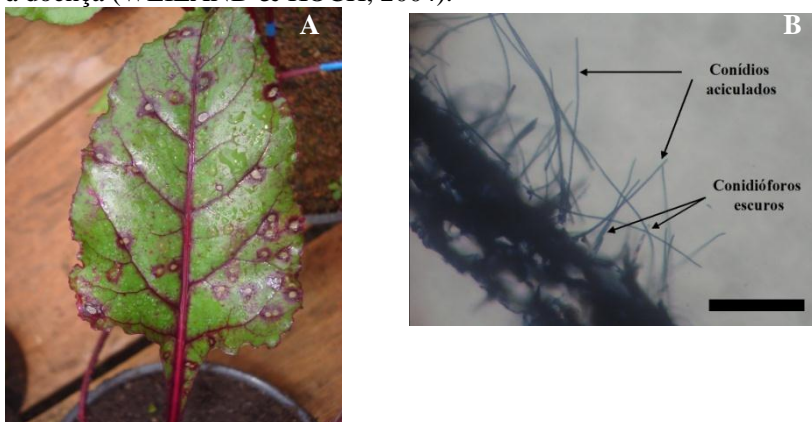


Figura 4. Sintomas de cercosporiose na folha de beterraba (A). Corte histológico transversal de uma lesão esporulante em aumento de 1200x (B). Barra =100 μ m.

Cultivares de beterraba com resistência poligênica e quantitativa têm sido pesquisadas, porém com o exato número de genes do hospedeiro envolvidos no processo ainda desconhecido (SMITH, 1987). A resistência monogênica é apresentada pelas cultivares que possuem o gene *Cb*, as quais se defendem da infecção através de resposta de hipersensibilidade. Já há relatos da quebra da resistência monogênica pelo surgimento da raça 2 de *C. beticola*, a qual afeta também as cultivares portadoras do gene de resistência *Cb* (LEWELLEN & WHITNEY, 1976).

O controle da doença é realizado principalmente pela aplicação de fungicidas protetores e curativos, sendo que hoje encontram-se registrados no Ministério da Agricultura 19 produtos formulados, com destaque para os sistêmicos de ação curativa do grupo dos triazóis e estrobilurinas (10 produtos) (FILGUEIRA, 2003; MAPA, 2011). No entanto, grande diversidade genética entre isolados monospóricos é encontrada, assim como a resistência desses aos fungicidas (IOANNIDIS & KARAOGLANIDIS, 2000).

1.3. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

A resistência induzida é um fenômeno no qual as plantas podem tornar-se mais resistentes à infecção de alguns patógenos mediante um estresse prévio, ou uma pré-infecção. O processo foi inicialmente descrito por Ross (1961), quando plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L. var. Samsun NN), hipersensitivas ao vírus do mosaico (*Tobacco mosaic virus*) foram inoculadas e passaram a expressar maior resistência a uma segunda inoculação em partes da planta que ainda não haviam entrado em contato com o vírus. A esse processo, Ross chamou de Resistência Sistêmica Adquirida (RSA).

Hoje, são descritos dois fenômenos biológicos distintos que culminam com a resistência induzida: além da RSA há também a Resistência Sistêmica Induzida (RSI). Enquanto a RSA pode resultar em acúmulo de espécies reativas de oxigênio e culminar em resposta de hipersensibilidade, além de aumentar os níveis de ácido salicílico e de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), na RSI não há alterações visíveis no tecido do hospedeiro e não há acúmulo de proteínas-RP (VAN LOON et al., 1998). A RSA pode ser desencadeada através de indutores oriundos de organismos vivos, como leveduras, bactérias, ou mesmo fungos micorrízicos, que em contato com as plantas, estimulam-nas a desencadear seus mecanismos de defesa. Radiação ultravioleta, pH, temperatura, injúrias mecânicas e compostos químicos, são conhecidos como indutores abióticos, os quais também podem desencadear a RSA (STADNIK; MARASCHIN, 2004; CAVALCANTI et al., 2005).

O estabelecimento gradual da RSA geralmente inicia-se com a resposta de hipersensibilidade (RH). Esse é um mecanismo resultante de uma interação incompatível gene-a-gene, entre um patógeno portador de um gene de avirulência dominante (Avr) e uma planta portadora do gene de resistência dominante (R). A partir do reconhecimento de elicitores

provenientes do patógeno, ocorre na planta a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas com alto poder oxidativo, que causam o colapso das células no local onde o patógeno tenta infectar (RESENDE et al., 2003). Os elicitores podem ser componentes da superfície microbiana, ou produtos de sua degradação, como monômeros de quitina, liberados durante o processo de infecção, os quais podem ser reconhecidos por receptores presentes na superfície da célula vegetal (DIXON et al., 1994; SOBRINHO et al., 2005). Polissacarídeos de plantas e animais, microrganismos não patogênicos e outros produtos também podem funcionar como elicitores.

A formação das espécies reativas de oxigênio, com destaque para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), precede a formação de ácido salicílico, uma molécula relacionada à sinalização da resistência sistêmica e à ativação de genes responsáveis pela transcrição de proteínas-RP (RESENDE et al., 2003; AGRIOS, 2005).

As EROs ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém quando acumuladas são tóxicas às células das plantas. Devido a isso, são necessários mecanismos que regulem suas quantidades, como a presença de moléculas antioxidantes, a exemplo dos carotenóides e antocianinas, ou enzimas responsáveis pela detoxificação celular, como o complexo ascorbato peroxidase e a catalase. A primeira atua principalmente nos cloroplastos, eliminando o H_2O_2 formado durante a fotossíntese. As catalases, com suas diferentes isoformas, estão envolvidas em diversos processos celulares, como a eliminação do H_2O_2 produzido durante o processo da respiração celular, ou no processo de espessamento da parede celular e lignificação (YOSHIMURA et al., 2000, RESENDE et al., 2003; VAN LON et al., 2006).

Além da detoxificação, as peroxidases podem utilizar o H_2O_2 para oxidar alguns substratos, como o ácido cinâmico e o ácido ferúlico, que quando convertido em diferúlico atua na ponte de hemicelulose unindo o ácido cinâmico aos carboidratos e às proteínas da parede celular, tornando-a mais rígida (GASPAR et al., 1982). Elas também estão envolvidas na polimerização de álcoois em lignina (HARKIM & OBST, 1973).

Gay & Tuzun (2000) demonstraram que a presença de peroxidases no fluido hidatodial de plantas de repolho está relacionada à lignificação dos hidatódios e à resistência da planta contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas. A atividade de peroxidases e o acúmulo de lignina também estão relacionados à resistência sistêmica em pepino (*Cucumis sativus*

L.) contra *C. lagenarium* (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). Dado esse envolvimento na resistência de plantas, as peroxidases estão classificadas no grupo das proteínas-RP dentro da família PR-9, representada por suas diferentes isoenzimas (CAVALCANTI et al., 2005)

Por sua vez, as enzimas glucanases são proteínas-RP, pertencentes à família PR-2, que possuem a capacidade de hidrolisar glucanas, componentes da parede celular fúngica. São diferenciadas em suas formas básicas e ácidas. Enquanto a primeira fica armazenada no vacúolo, as formas ácidas estão presentes na parede celular vegetal, e possuem ação direta contra as hifas de patógenos durante o processo infeccioso (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

As enzimas glucanases podem estar envolvidas na defesa da planta contra doenças foliares ou de pós-colheita. Brisset et al. (2000) demonstraram que a pulverização preventiva do indutor de resistência acibenzolar-S-metílico (ASM) em macieira reduziu a incidência do fogo bacteriano causado por *Erwinia amylovora*, e elevou a síntese de enzimas β -1,3 glucanases em folhas jovens, que ainda não estavam completamente expandidas. Em plantas de tomate, a aplicação de ASM também elevou a atividade de glucanases e as plantas que receberam o produto tiveram menor severidade da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria* (DI PIERO, 2003). Em frutos de maçã, algumas leveduras antagonistas isoladas da superfície de grãos de uva demonstraram potencial como agentes de biocontrole, reduzindo a severidade das podridões de *P. expansum* e de *B. cinerea*, após a ativação das enzimas quitinases, peroxidases e β -1,3 glucanases (IPPOLITO et al., 2000).

Outra enzima envolvida no processo de lignificação trata-se da fenilalanina amônia-liase (FAL). A FAL é uma enzima tetramérica com dois sítios ativos, que em dicotiledôneas catalisa a desaminação da fenilalanina e leva à formação de ácido cinâmico, o qual entra na rota geral dos fenilpropanóides. A invasão do vegetal por fungos induz à transcrição de mRNA que codifica para a sua síntese, e conseqüentemente, aumenta a produção de compostos fenólicos. A partir do ácido cinâmico são produzidos fenilpropanóides simples, como os ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico, além dos ácidos benzóico, p-hidroxibenzóico e salicílico. A lignina, substância que confere maior resistência à parede celular é formada por uma mistura de fenilpropanóides simples (JONES, 1984; BOLWELL, 1988; DIXON & PAIVA, 1995).

Kirkham (1957), ao extrair compostos fenólicos totais de folhas de macieira e injetar em pecíolo de folhas de uma cultivar suscetível, demonstrou que essa apresentava maior resistência à sarna. Assim, sugeriu que algum composto presente naquele extrato estava atuando na defesa da planta contra o fitopatógeno. Mikulic Petkovsek et al. (2009) observaram que a inoculação com *V. inaequalis* resulta no acúmulo de diversos compostos fenólicos como ácido ferúlico, ácido p-cumárico e ácido protocatecóico nas lesões de sarna e na região de transição entre tecido sadio e doente.

A partir da mesma rota metabólica dos fenilpropanóides, originam-se os flavonóides, classe à qual pertencem algumas fitoalexinas, substâncias de baixo peso molecular que atuam diretamente contra a infecção por fitopatógenos (STICHER et al., 1997).

Em macieira, uma fitoalexina conhecida é a floridizina, juntamente com sua fração aglicona chamada floretina. Trata-se de uma dihidrochalcona, que quando degradada a ácido florético e a ácido *p*-hidroxibenzóico, apresenta toxicidade contra a infecção por *V. inaequalis*. Seu conteúdo nas folhas é incrementado quando infectadas pelo fungo (MIKULIC PETKOVSEK et al., 2009). Obwald & Elstner (1988) relataram que macieiras resistentes à sarna continham altos níveis de floridizina. A presença de floridizina e flavonóides é tida como fundamental na resistência da macieira a *V. inaequalis* (LESER & TREUTTER, 2005).

Deste modo, entende-se que uma possível elicitação tanto de produtos do metabolismo primário, como as proteínas-RP, quanto do metabolismo secundário, como compostos fenólicos e seus derivados, (dihidroxichalconas e flavonóides), mediante a aplicação de produtos como polissacarídeos, leveduras, sais, entre outros, possa contribuir na redução de doenças de plantas.

1.3.1. Produtos potencialmente elicitores de resistência em plantas

1.3.1.1. Fosfitos

Os fosfitos são sais derivados da neutralização do ácido ortofosfórico (H_3PO_4) ou do ácido fosforoso (H_3PO_3) através de cátions como NH_4^+ , Na^+ ou K^+ . Quando o ácido ortofosfórico ou o fosforoso são neutralizados pela adição de hidróxido de potássio (KOH), têm-se a formação dos fosfitos de potássio K_3PO_4 ou K_2HPO_3 , respectivamente (LANDSCHOOT & COOK, 2005; NOJOSA et al., 2005).

Desde a década de 1950, tem-se estudado o efeito da aplicação de fosfitos como fonte de fósforo (P) para a nutrição de plantas. Entretanto, MacIntire et al. (1950) observaram que altas doses de fosfito prejudicavam o desenvolvimento de plantas jovens. Estudos posteriores demonstraram que o efeito deletério da utilização de fosfitos para fornecimento de P são acentuados quando as plantas estão deficientes desse macronutriente (CARSWELL et al., 1996).

Uma das respostas do vegetal em situação de deficiência de fósforo é o aumento do crescimento de raízes. Carswell et al. (1996), quando utilizaram fosfito como fonte de P para plantas de mostarda-preta (*Brassica nigra*) desenvolvidas em ambiente com déficit do nutriente, verificaram que esse suprimiu o crescimento de raízes em relação à parte aérea.

Sugere-se que o fosfito de potássio se assemelhe ao fósforo na sinalização de vias bioquímicas na planta, inibindo aquelas responsáveis pela adaptação do vegetal ao ambiente com déficit de fosfato, porém, diferente desse, o fosfito não é utilizado pelo vegetal como um nutriente, uma vez que não se têm conhecimento de enzimas em plantas capazes de oxidar fosfito a fosfato, resultando conseqüentemente em danos ao seu desenvolvimento (THAO & YAMAKAWA, 2009). Entretanto, em alguns casos, a aplicação de fosfitos pode resultar em incremento de área foliar fotossinteticamente ativa, como divulgado por Silva et al. (2011). Alguns autores indicam que o efeito positivo da aplicação de fosfitos sobre o desenvolvimento das plantas é resultado da redução de infecções por fitopatógenos (MCDONALD et al., 2001).

Entre as doenças que são reduzidas pela aplicação de fosfitos, destacam-se aquelas causadas por oomicetos dos gêneros *Phytophthora* e *Plasmopara* e fungos do gênero *Alternaria* (LANDSCHOOT & COOK, 2005). Dianese et al. (2009) testaram formulações de fosfitos de potássio, cálcio e de magnésio, e verificaram que todos eles reduziram a podridão do pé do mamoeiro, causada por *P. palmivora*.

Com respeito aos mecanismos de ação, sabe-se que os fosfitos podem afetar alguns patógenos diretamente, atuando tanto sobre a germinação de esporos quanto no crescimento micelial. Sobre a germinação de esporos de *Verticillium dahliae*, agente causal da murcha-de-*Verticillium* em cacau (*Theobroma cacao*), o fosfito de potássio na concentração de $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$, inibiu completamente a emissão de tubo germinativo do fungo (RIBEIRO et al., 2006). Amiri & Bompeix (2011) obtiveram completa inibição da germinação *in vitro* de *P. expansum*, em meio de cultura contendo 4 mg.mL^{-1} de fosfito de

potássio. Porém, a sensibilidade dos patógenos ao fosfito pode diferir com o estágio de desenvolvimento do fungo. Nojosa et al. (2009) testaram diferentes doses de fosfito de potássio a fim de verificar se havia efeito direto sobre *Phoma costaricensis*, agente causal da mancha de *Phoma* em cafeeiro, e verificaram que o produto afeta o crescimento micelial e não a germinação de esporos, até a dose de $10 \mu\text{L.mL}^{-1}$. Araujo et al. (2008) demonstraram que o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, agente causal da mancha foliar da Gala (MFG), é retardado em meio de cultura contendo concentrações relativamente baixas de fosfito de potássio, sendo que a maior dose testada ($0,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$) reduziu a velocidade de crescimento micelial cerca de 50%, em pH 7,0. Porém, quando o pH do meio de cultura não foi corrigido após a adição de fosfito (pH 2,0), houve inibição quase completa do crescimento micelial com a mesma dose do produto. Assim, indica-se que além do efeito direto do sal, o seu caráter ácido também influenciou no desenvolvimento do fungo. Smillie et al. (1989) demonstraram que três diferentes espécies de oomicetos do gênero *Phytophthora* tiveram completa inibição do crescimento micelial após 7 dias em meio de cultura contendo fosfito de potássio na dose de $8000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Além de afetar a germinação de esporos de fitopatógenos e o crescimento micelial, a aplicação preventiva de fosfito de potássio pode diminuir a esporulação de colônias de oídio (*Leveillula taurica*) formadas em folhas de pimenteiras e diminuir os comprimentos de conídios e conidióforos, como demonstrado por Reuveni et al. (1998). No mesmo estudo, colapso de hifas do fungo também foi observado no tecido do hospedeiro.

Quimette & Coffey (1989) quantificaram os teores de fosfito de potássio em diferentes partes de mudas de abacateiro e verificaram que houve acúmulo do sal nas folhas jovens da planta, tanto quando essas receberam o produto através de pulverizações da parte aérea, ou quando o fosfito foi adicionado no solo. Smille et al. (1989) demonstraram que plântulas de tremoço que tiveram as raízes tratadas com fosfito de potássio acumularam o produto na parte aérea, e apresentaram menor lesão de *P. cinnamomi*. A concentração no tecido da planta foi semelhante à que reduziu o desenvolvimento do patógeno *in vitro*, indicando que o controle da doença foi resultado do efeito direto do produto sobre o patógeno. Em alguns casos, a utilização de fosfito de potássio demonstra maior efeito quando aplicado curativamente, como demonstrado por Araújo et al. (2008), onde mudas de macieira pulverizadas 24 hs após a inoculação com *C. gloeosporioides*

apresentaram redução da severidade da MFG em 90%, enquanto aquelas que foram pulverizadas 6 ou 3 dias antes apresentaram severidade de doença igual à testemunha pulverizada com água.

Amiri & Bompeix (2011) relacionaram o efeito direto do fosfito de potássio à redução da incidência de bolor azul (*P. expansum*), e sua eficiência foi incrementada quando o produto foi associado com a imersão dos frutos em água quente. Frutos das duas principais cultivares plantadas em Santa Catarina, Gala e Fuji, apresentaram menor severidade da doença quando imersos em solução de fosfito de potássio a $0,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ por 15 segundos (BLUM et al., 2007).

Outra forma de controle de doenças de plantas relacionada ao uso de fosfitos pode ser através da indução de mecanismos de defesa estruturais e/ou bioquímicos. Daniel & Guest (2006) estudaram o efeito do desafio de *P. palmivora* a *Arabidopsis thaliana*, após a aplicação de fosfito de potássio, e demonstraram que as plantas tratadas com o sal apresentaram tanto mecanismos de defesa estruturais, como agregação citoplasmática e deposição de calose e lignina no local da infecção, quanto bioquímicos como o incremento no teor de compostos fenólicos totais e de radicais superóxido (O_2^-), precursor de reação de hipersensibilidade, sugerindo que o produto pode atuar como um indutor de resistência. Ribeiro et al. (2006) por sua vez, não observaram aumento da atividade de enzimas peroxidases em mudas de cacaueiro, o que indica a variação de resposta em decorrência do uso de fosfito de acordo com o tipo de hospedeiro. Dercks & Creasy (1989) verificaram que em videira a aplicação preventiva de fosfito aumentou a concentração da fitoalexina resveratrol em plantas resistentes a *Plasmopara viticola*.

1.3.1.2. Quitosana

A quitina, precursora da quitosana, foi descoberta em 1811 por Henri Braconnot a partir de cogumelos, recebendo então o nome de fungina. Em 1823, Odier isolou-a de insetos e a denominou de quitina, porém, apenas em 1843 Payen descobriu que havia nitrogênio na sua estrutura. Quitina e quitosana podem ser encontradas na parede celular de fungos, exoesqueletos de insetos e carapaças de crustáceos (CRAVEIRO et al., 2004).

O beneficiamento de crustáceos, como o camarão, por exemplo, pode gerar grande quantidade de resíduos, devido ao baixo valor comercial do cefalotórax, o qual representa até 33% do tamanho do

animal no caso de *Litopenaeus vannamei*. Sem aproveitamento tecnológico, esses resíduos acarretam custos ambientais e econômicos no seu descarte (NUNES, 2001).

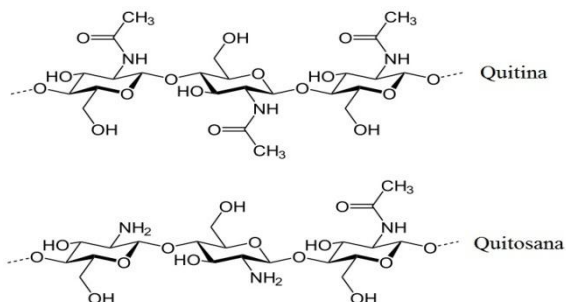


Figura 5. Estrutura química da quitina e da quitosana. Adaptado de No & Meyers (1997).

Uma das formas de aproveitamento dos resíduos gerados no beneficiamento de crustáceos é a desacetilação da quitina para a síntese de quitosana (Figura 5), um biopolímero formado por repetições de N-acetil-D-glucosamina, que possui efeito antimicrobiano, e a capacidade de formar géis (KHOR & LIM, 2003).

A quitosana é insolúvel em água e, em soluções diluídas de ácidos, comporta-se como um biopolímero catiônico, de composição variável em função do grau de desacetilação. Quanto maior a quantidade de grupos amino protonados, maior a solvatação, devido à repulsão eletrostática entre as cadeias (SANTOS et al., 2003).

Entre os parâmetros relacionados à atividade biológica da quitosana estão o grau de desacetilação e a massa molar. O efeito antimicrobiano da quitosana aumenta com o percentual de desacetilação, pois disso resulta maior número de grupamentos aminos, os quais em função do pH podem apresentar cargas positivas capazes de interagir com cargas negativas expostas na superfície das células fúngicas, o que dificulta o movimento de moléculas através da membrana. Outra hipótese é a de que a quitosana possa dificultar a transcrição do DNA do patógeno (FANG et al., 1994).

Suspensões de quitosana podem formar biofilmes sobre produtos vegetais *in natura* ou minimamente processados, e evitam a desidratação e o desenvolvimento de microrganismos (ASSIS & LEONI, 2003). No caso de recobrimento de sementes, o biofilme pode

influenciar positivamente a germinação e o vigor em algumas espécies, ou ainda diminuir a incidência de tombamento de plântulas causado por fungos de solo (REDDY et al., 1999; TANADA-PALMU et al., 2005; MAZARO et al., 2009).

Diversos testes *in vitro* demonstraram que algumas espécies de fungos, quando germinam na presença de quitosana, apresentam alterações morfológicas no tubo germinativo. Também pode haver danos às células de hifas e retardamento do crescimento micelial quando os fungos crescem em meio de cultura contendo quitosana. O efeito geralmente é relacionado com a concentração do polissacarídeo (EL GHOUTH et al., 1994; LIU, 2007; FELIPINI & DI PIERO, 2009).

Outra característica da quitosana estudada é a capacidade de induzir respostas de defesa em plantas. Essa ação assemelha-se ao que ocorre com a planta atacada por fungos, quando monômeros de quitina, produzidos pela degradação da hifa na superfície foliar, geram um sinal no sítio de recepção das células e disparam reações bioquímicas, as quais culminam na ativação de mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos (SOBRINHO et al., 2005). No entanto, no caso da quitosana, ao invés de um receptor específico na célula da planta, a elicitação ocorre através da interação das cargas policatiônicas da molécula com fosfolipídios da superfície celular do vegetal (KAUSS et al., 1989).

Mazaro et al. (2009) observaram que o recobrimento de sementes com quitosana aumentou a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), envolvida na rota metabólica de alguns compostos relacionados à defesa da planta, e resultou na redução do tombamento de plântulas de tomate causado por *Rhizoctonia* sp. O aumento da atividade da mesma enzima foi observado por Khan et al. (2003) em folhas de soja, 24 e 36 horas após a pulverização de oligômeros de quitosana.

Em feijoeiro-comum, a pulverização preventiva de quitosana reduziu a severidade da antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, e seu efeito foi relacionado tanto a sua capacidade de atuar diretamente contra o patógeno, quanto de elicitar a atividade de enzimas de defesa β -1,3 glucanases (DI PIERO & GARDA, 2008). Além de β -1,3 glucanases, a aplicação de quitosana elevou a atividade da enzima de defesa quitinase, a qual atua diretamente sobre a parede celular de fungos, em folhas de amendoim desafiadas com *Puccinia arachidis* (SATHIYABAMA & BALASUBRAMANIAN, 1998).

A aplicação de quitosana também pode aumentar a concentração de compostos do metabolismo secundário relacionados à

defesa da planta. Reddy et al. (1999) observaram maiores teores de lignina e ácidos fenólicos em folhas de trigo provenientes de sementes imersas em quitosana. Agrawal et al. (2002) diagnosticaram a maior produção de fitoalexinas sakuretina e momilactona em folhas de arroz tratadas com quitosana, além de duas PR-proteínas.

Dessa forma, a utilização de quitosana na agricultura tem sido indicada como uma forma de controle de várias espécies de fitopatógenos, e uma alternativa ao uso de fungicidas químicos, porém seu modo de ação pode variar conforme os diferentes patossistemas.

1.3.1.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Diversos gêneros de fungos leveduriformes como *Pichia*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium*, e *Saccharomyces* têm sido estudados com a finalidade de controlar doenças de plantas, tanto foliares quanto de pós colheita (STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994; IPPOLITO et al., 2000; HRAZDINA, 2003; CHAN & TIAN, 2005).

Saccharomyces cerevisiae Meyen, é uma espécie fúngica da divisão Ascomycota, a qual produz ascos, mas não ascocarpos, sendo incluída na ordem Saccharomycetales. Por se tratar de uma levedura, não produz micélio e o crescimento da colônia se dá por brotação. Essa levedura é muito utilizada pelo homem na fabricação de pães e bebidas, atuando como agente transformador, porém sendo descartada no final do processo, quando se torna um sub-produto da indústria. Para a produção de 100 L de etanol, por exemplo, têm-se o potencial de produzir 2 kg de massa seca de levedura. Como a produção de etanol no Brasil em 2009-2010 ultrapassou 25 bilhões de litros, houve potencial de produção de 500 mil toneladas de células de *S. cerevisiae* (ISAAC, 1992; BUTOLO, 1996; AGRIOS, 2005; MDIC, 2011).

Um destino para essa biomassa poderia ser a agricultura com a finalidade de controlar doenças de plantas. Piccinin et al. (2005) demonstraram que a pulverização semanal de suspensão de células de *S. cerevisiae* sobre a parte aérea de sorgo (*Sorghum bicolor*) reduziu a severidade da mancha foliar causada por *Exserohilum turticum*. A mesma doença foi reduzida em plantas de milho pipoca (*Zea mays*), através de pulverizações semanais de suspensão de células da levedura, diminuindo também a esporulação do fungo sobre as lesões (STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994).

A partir da suspensão de células de *S. cerevisiae* pode-se separar a fração líquida da sólida, através de filtragem, e assim obter o

filtrado da suspensão de fermento à base de *S. cerevisiae*. A filtração pode ser precedida por autoclavagem ou não, porém, sabe-se que o filtrado da suspensão autoclavada possui maior atividade elicitora de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo (WULFF & PASCHOLATI, 1998). Quando esse filtrado foi aplicado sobre o mesmo hospedeiro, protegeu as plantas contra a antracnose causada por *C. graminicola*, através da redução da germinação de esporos e formação de apressórios do fungo (STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994).

Roncatto & Pascholati (1998) estudaram os efeitos da aplicação de suspensão celular de *S. cerevisiae* ou do filtrado da suspensão celular autoclavada ou não autoclavada sobre o metabolismo de enzimas peroxidases em folhas de milho e demonstraram que as plantas que receberam a pulverização de filtrado da suspensão celular autoclavada apresentaram maior atividade enzimática 48 e 72 horas depois do tratamento, em relação à testemunha.

A partir de cultivo de células de *S. cerevisiae* também pode-se extrair moléculas que atuam diretamente contra fitopatógenos, como demonstrado por Fialho (2004), quando compostos voláteis da cultura da levedura reduziram o crescimento micelial de *Guinardia citricarpa*, agente causal da pinta-preta do citrus.

Além de produzir compostos capazes de elicitar respostas de defesa ou de afetar fitopatógenos diretamente, a levedura *S. cerevisiae* também pode atuar como um agente de controle biológico através da competição por nichos de colonização, sintetizando antibióticos e competindo por nutrientes (PUNJA & UTKHEDE, 2003). A vantagem do seu uso é relacionada à sua aptidão natural de colonizar a superfície de folhas e frutos, por ser esse o seu habitat natural (WILSON & WISNIEWSKI, 1989).

1.3.1.4. Babosa

São conhecidas cerca de 180 espécies pertencentes ao gênero, *Aloe*, muitas das quais nativas do continente africano. Posteriormente, foram introduzidas em diversas partes do mundo, como Cabo Verde e as Ilhas Canárias, Europa e leste da Índia. Dentro do gênero, destacam-se quatro espécies: *A. ferox*, *A. saponaria*, *A. arborescens* e *A. barbadensis*, com destaque para a última, devido às suas propriedades medicinais (HALLER, 1990).

A espécie *A. barbadensis* é dióica, de porte arbustivo, com caule de 0,50 a 1,20 m de altura. As folhas são suculentas, dispostas em forma

de roseta, podem atingir 60 cm de comprimento, 9 cm de largura e 3 cm de espessura na base. Suas flores têm coloração amarelada, dispostas em racemos terminais com 30 a 40 cm de comprimento. O fruto é uma cápsula e as sementes pardo-escuras, achatadas e reniformes. A partir do corte transversal da folha, pode-se distinguir duas partes: uma mais externa, o parênquima clorofiliano, formado por uma camada de células epidérmicas impermeáveis e pelo mesófilo, onde se situam os canais condutores de seiva do parênquima clorofiliano, e uma mais interna, onde encontra-se o parênquima de reserva de aspecto vítrio e consistência mucilagínosa (SILVA JÚNIOR, 2003).

A partir do parênquima clorofiliano, extrai-se o látex da babosa. Trata-se de um líquido de coloração escura, sabor amargo e odor desagradável, rico em derivados hidroxiantracênicos, substâncias de baixo peso molecular, com destaque para os isômeros aloína A e aloína B, ou barbaloina, constituinte químico de algumas drogas vegetais devido ao seu efeito catártico (HAY & HAYNES, 1956; WHO, 1999).

Do parênquima de reserva da babosa, por sua vez, é extraído o suco da babosa, um gel composto por mais de 99% de água, rico em açúcares, com destaque para o polissacarídeo acemanana. Este é formado por unidades de manose, unidas por ligações β -1,4 e acetiladas no carbono C2 ou C3, podendo ocorrer na cadeia também unidades de glucose não acetiladas. No carbono C6 da manose, pode ocorrer a ligação de unidades de galactose, através de ligações β -1,6. No gel também pode haver traços de outros açúcares como xilose, arabinose e ramnose, sendo que suas quantidades estão relacionadas às condições de cultivo (WALLER et al., 1978; FEMENIA et al., 2003).

O parênquima de reserva tem sido estudado principalmente em relação às suas propriedades medicinais (WALLER et al., 1978; CAMPESTRINI, 2007; JIA et al., 2008). No entanto, seu efeito antimicrobiano contra fungos fitopatogênicos também tem sido relatado. A germinação e o crescimento micelial dos fungos causadores de podridões de pós-colheita *P. digitatum*, *P. expansum*, *B. cinerea* e *A. alternata* foram reduzidos quando na presença do extrato do parênquima de reserva, e a colonização nos frutos foi retardada (SAKS & BARKAI-GOLAN, 1995). O efeito direto sobre outros fungos fitopatogênicos como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum coccodes*, também já foi relatado (RODRIGUEZ et al., 2005). Além do efeito direto, relata-se a possibilidade do extrato de folhas de babosa em induzir a síntese de compostos de defesa em plantas. Stangarlin et al. (1999) demonstraram que o extrato aquoso da folha da babosa aumentou

a síntese de fitoalexinas deoxiantocianidinas e gliceolína em mesocótilos de sorgo e soja, respectivamente.

1.3.1.5. Acibenzolar-S-metílico

O acibenzolar-S-metílico (ASM) é um éster-S-metil do ácido benzo (1,2,3) tiadiazole-7-carbótico, com a fórmula molecular $C_8H_6N_2OS_2$, (FCI, 2010). Trata-se do ingrediente ativo do único indutor de resistência comercial registrado no Ministério da Agricultura do Brasil, sob a marca Bion[®] (Syngenta). É um produto com formulação WG - Granulado Dispersível, com classificação toxicológica III - medianamente tóxico, e perigoso ao ambiente (classe III na classificação ambiental). Seu uso é registrado para uma série de culturas, como feijão, tomate, citrus e algodão, entre outras, para a prevenção de infecções fúngicas e bacterianas, além de viroses (MAPA, 2011).

O ASM é absorvido e translocado pela planta e atua como um mensageiro secundário, independente do ácido salicílico, resultando na expressão de genes relacionados à resistência sistêmica adquirida (BENHAMOU & BÉLANGER, 1998).

Em macieira, a atuação do ASM como indutor de resistência foi demonstrada por Brisset et al. (2000) os quais verificaram que a diminuição do fogo bacteriano causado por *Erwinia amylovora* através da aplicação preventiva de ASM em mudas de macieira estava relacionada ao aumento da síntese de proteínas-RP peroxidases e β -1,3 glucanases. A eficácia do ASM em controlar essa doença foi confirmada por Maxson-Stein et al. (2002), através da pulverização semanal das plantas, sendo que os autores demonstraram que a aplicação do produto ativou diferentes famílias de genes relacionados à RSA. No caso da sarna causada por *V. inaequalis*, Bengtsson et al. (2009) estudando o processo infeccioso do patógeno em folhas de macieira, observaram que a germinação de esporos não é afetada, porém o processo de penetração do patógeno no tecido da planta é dificultado quando essas são pulverizadas preventivamente com o ativador de defesas.

Estudando a atividade de proteínas-RP em folhas de eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) com diferentes estágios de desenvolvimento, Boava et al. (2010) demonstraram que folhas suscetíveis pulverizadas com ASM apresentaram incremento na atividade de enzimas quitinases quando desafiadas por *Puccinia psidii* (ferrugem), enquanto que folhas que estavam em estágio de

desenvolvimento avançado, ou seja, resistentes à doença, não tiveram a atividade dessas enzimas alteradas pela aplicação do produto.

Redução da severidade da murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*) em caupi (*Vigna unguiculata*) através da aplicação de ASM (50 mg.L⁻¹) foi relatada por Rodrigues et al. (2006), ao mesmo tempo em que as plantas que foram pulverizadas com o produto apresentaram maiores atividade de proteínas-RP peroxidases, β -1,3 glucanases e fenilalanina amônia-liase.

Em cacaueiro, Resende et al. (2007) obtiveram redução da incidência de vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) quando as mudas foram pulverizadas com ASM (200 mg.L⁻¹) 7 dias antes de inocular o patógeno, sendo que as brotações novas das plantas apresentaram maior atividade de enzimas peroxidases em relação às pulverizadas com água dos 4 aos 18 dias após a inoculação.

Stadnik & Buchenauer (1999) observaram que plantas de trigo suscetíveis ao oídio (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) previamente pulverizadas com ASM apresentaram acúmulo de compostos autofluorescentes de origem fenólica, sob o sítio de penetração do patógeno, os quais podem dificultar a infecção pelo fungo. As plantas que receberam a aplicação do indutor apresentaram concomitantemente aumento da atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase (FAL), enzima chave na rota dos fenilpropanóides. A importância da FAL na resistência induzida em trigo por ASM foi confirmada quando plantas que tiveram a atividade da enzima inibida pela utilização de ácido- α -aminooxi β -fenil propiônico não apresentaram resposta de resistência induzida por ASM (STADNIK & BUCHENAUER, 2000). Em cevada, Siegrist et al. (1998) após a aplicação do indutor, obtiveram aumento da síntese de filoalexinas derivadas do ácido cinâmico formado pela atividade da FAL (SANTOS, 2001). A atividade da FAL também é relacionada ao controle da podridão-parda (*Monilinia fructicola*) em pêssegos em condições de pós-colheita (DANNER et al., 2008).

Devido às possíveis alterações em vias biossintéticas, os ativadores de defesa podem ter um custo fisiológico à planta. Barbosa et al. (2008) aplicaram ASM (100 mg.L⁻¹) aos 15 e 25 dias após a emergência de algodoeiro, e demonstraram que houve retardo no desenvolvimento das plantas que receberam o produto, como menores altura e comprimento de internódios, e redução de massa fresca e seca da parte aérea.

CAPÍTULO 2 – FOSFITO DE POTÁSSIO, QUITOSANA, *Saccharomyces cerevisiae* Meyen E POLISSACARÍDEOS DE BABOSA (*Aloe barbadensis* Miller), PARA O CONTROLE DA SARNA DA MACIEIRA (*Venturia inaequalis* Cooke)

2.1. INTRODUÇÃO

A macieira é uma planta lenhosa e frutífera, originária de regiões de altitude elevada do leste da Ásia, sendo que passou a ser cultivada com a finalidade de produção de frutos há cerca de 2200 anos na Grécia. No Brasil, seu cultivo iniciou na segunda metade do século XX, incentivado principalmente por imigrantes de origem Argelina situados na cidade de Fraiburgo, no estado de Santa Catarina, o qual se tornou hoje o principal produtor de maçãs do país. Apesar do incremento de produtividade nos últimos anos, alguns fatores ainda limitam o aumento da produção e a redução de custos (BLEICHER, 2002; NACHTIGALL, 2004). Entre eles está a sarna da macieira (*Venturia inaequalis*), a principal doença fúngica da cultura em regiões com primavera de clima ameno. A sarna da macieira pode incidir sobre ramos, pedicelos, pecíolos e folhas, causando queda precoce e diminuição da área foliar fotossinteticamente ativa. Quando incide sobre os frutos, a doença pode inviabilizar a comercialização, ou diminuir o valor do produto (VALDEBENITO-SANHUEZA & BETTI, 2005).

Historicamente, o controle da doença está baseado na aplicação de fungicidas protetores, e mais recentemente, também curativos e erradicantes (VALDEBENITO-SANHUEZA & BETTI, 2005). Com o passar dos anos, alguns princípios ativos como os benzimidazóis perderam sua eficiência devido à seleção de populações do patógeno resistentes (AKUTU & TANAKA, 1977). Nos últimos anos, a aplicação de fungicidas com efeito pós-infecção está baseada no grupo dos Inibidores da Biossíntese do Ergosterol (IBE), porém sua eficiência também está diminuindo gradativamente (KATSURAYAMA & BONETI, 1997).

Aliado a esse fato, a crescente preocupação em relação ao uso de agrotóxicos, e a busca por produtos menos impactantes ao homem e ao ambiente, têm motivado o desenvolvimento de novas práticas de controle de doenças em plantas, como a produção integrada de maçã e a produção orgânica. Enquanto na primeira a utilização de agrotóxicos é limitada (CNPUV, 2011), na produção orgânica ela é proibida, necessitando-se assim de outras formas de controle.

Sabe-se que alguns produtos de menor impacto ambiental têm a capacidade de controlar doenças em plantas, tanto através de seu efeito direto sobre fitopatógenos, quanto pela indução de mecanismos de defesa.

Quitosana é um polissacarídeo de baixa toxicidade, derivado da desacetilação da quitina, extraída principalmente das carapaças de crustáceos (CRAVEIRO et al., 2004). Além de apresentar efeito antimicrobiano, o polissacarídeo pode induzir resistência nas plantas (SOBRINHO et al., 2005; DI PIERO & GARDA, 2008). Também tem sido utilizado para recobrir vegetais *in natura*, ou minimamente processados, protegendo-os de infecções e da desidratação (ASSIS & LEONI, 2003; TANADA-PALMU et al., 2005)

Do parênquima de reserva das folhas da babosa, pode-se extrair um gel rico em polissacarídeos, como a acemanana, que apresenta uma estrutura semelhante à da quitosana. O gel da babosa tem propriedades medicinais, atuando na cicatrização de ferimentos em animais, sendo também empregado na composição de cosméticos e fabricação de alimentos funcionais. Possui ainda efeito antimicrobiano contra patógenos de plantas, como *Penicillium expansum*, *P. digitatum*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata* (SAKS & BARKAI-GOLAN, 1995), entre outros.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada para a produção de etanol, apresenta componentes na parede celular capazes de ativar defesas em plantas (RONCATTO & PASCHOLATI, 1998). A grande biomassa de levedura gerada anualmente poderia ser destinada como matéria-prima para a produção de compostos que atuem no controle de doenças de plantas.

O fosfito de potássio, por sua vez, é comercializado como um adubo foliar, aplicado para suprir a necessidade de fósforo e potássio. Porém, sabe-se que a pulverização do produto pode contribuir para o controle de doenças de plantas, como o oídio da pimenteira causada por *Leveillula taurica* (REUVENI et al., 1998), a mancha foliar da gala (*C. gloeosporioides*) (ARAUJO et al., 2008), e o bolor verde em maçã (*P. expansum*) (AMIRI & BOMPEIX, 2011). Sais de fosfito têm demonstrado atividade antimicrobiana (RIBEIRO et al., 2006; NOJOSA et al., 2009; AMIRI & BOMPEIX, 2011) e induzido resistência em plantas contra fitopatógenos (DANIEL & GUEST, 2006; DERCKX & CREASY, 1989).

Diante disso, buscou-se neste trabalho avaliar o adubo foliar fosfito de potássio, o polissacarídeo quitosana, o filtrado da suspensão

autoclavada de fermento à base da levedura *S. cerevisiae*, assim como a suspensão bruta do fermento, além da fração polissacarídica extraída do parênquima de reserva de folhas de babosa, para o controle da sarna da macieira, e elucidar os mecanismos de ação envolvidos num eventual controle.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da pulverização de produtos potencialmente indutores de resistência no controle da sarna da macieira e na ativação de mecanismos bioquímicos de defesa da planta.

2.2.2. Objetivos específicos

- Testar o efeito da pulverização preventiva de fosfito de potássio, quitosana, suspensão de fermento à base de *Saccharomyces cerevisiae* (SBSC), filtrado da suspensão de fermento autoclavado (FASC) e fração polissacarídica do parênquima de reserva da babosa (FPPRB), no controle da sarna da macieira;
- Avaliar alterações bioquímicas (atividades de enzimas peroxidases e β -1,3 glucanases, teores de flavonóides e compostos fenólicos totais) em folhas de macieira, suscetíveis e resistentes à sarna, pulverizadas com possíveis agentes elicitores;
- Verificar se fosfito de potássio e quitosana inibem a germinação de esporos de *V. inaequalis* em bioensaios *in vitro*.

2.3. HIPÓTESES

- Plantas de macieira pulverizadas com produtos potencialmente indutores de resistência apresentam menor severidade de sarna após a inoculação com *Venturia inaequalis*.
- O controle da doença é relacionado a mecanismos de defesa bioquímicos pós-formados e/ou ao efeito direto de algum dos produtos sobre a germinação de esporos do patógeno.

2.4. METODOLOGIA

2.4.1. Obtenção e preparo dos produtos

As preparações utilizando fosfito de potássio foram realizadas a partir do produto comercial Fitofos K Plus[®], formulado com 40% P₂O₅ e 20% K₂O, e as concentrações ajustadas por diluição do produto em água destilada.

O polissacarídeo quitosana, com 85% de desacetilação, proveniente da China (lote de fabricação: HP20051026), foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luíz Henrique Beirão do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos/UFSC, e apresenta fórmula molecular (C₈H₁₃NO₅)_n. A suspensão do polissacarídeo foi preparada pela dissolução em HCl 0,05 N com agitação constante e correção do pH para 5,6 com NaOH 2M.

A fonte de células da levedura *S. cerevisiae* foi o produto comercial Fermento Biológico Fresco Fleischmann[®]. O produto foi dissolvido em água destilada estéril (ADE) na concentração de 25 mg.mL⁻¹ e utilizado nas plantas, constituindo a “Suspensão Bruta de *Saccharomyces cerevisiae* - (SBSC). Parte da SBSC foi autoclavada por duas vezes à temperatura de 121 °C por 20 minutos, e filtrada em papel de filtro Whatman[®] com poros de 14 µm, seguida por filtração em membrana de acetato celulose com poros de 0,2 µm. Essa preparação foi denominada “Filtrado Autoclavado de Fermento à Base de *Saccharomyces cerevisiae*” - (FASC).

A extração da fração polissacarídica do parênquima de reserva da babosa (FPPRB), foi realizada a partir de folhas adultas de *A. vera*. Após a retirada da epiderme, e da excisão das extremidades das folhas, elas foram trituradas em liquidificador e o gel foi filtrado e pesado. A precipitação dos polissacarídeos foi realizada em etanol 92% na proporção de cinco partes de álcool para cada parte de gel e a mistura mantida a 4 °C por uma hora, quando então foi filtrada sob vácuo e pesada. A fração polissacarídica total foi disposta em estufa a 50 °C durante 24 horas para secagem.

2.4.2. Efeito dos produtos sobre a severidade da sarna da macieira e amostragem para realização de testes bioquímicos

Os ensaios para verificar o efeito protetor dos produtos em mudas de macieira contra a sarna foram conduzidos em casa de

vegetação na estação experimental da Epagri, no município de São Joaquim/SC, nos meses de setembro a dezembro de 2009 (dois experimentos), e entre outubro e meados de novembro de 2010 (um experimento), e contou-se com o auxílio de pesquisadores e técnicos da instituição.

Mudas de macieira da cultivar Gala enxertadas sobre o porta-enxerto Marubakaido, contendo uma haste, foram cultivadas em vasos contendo 2 L de solo. O solo foi preparado pela mistura de esterco de gado (1 parte), vermiculita (2 partes) e areia (2 partes). A quebra de dormência ocorreu pela manutenção das plantas em câmara frigorífica ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), e quando necessário foram transferidas para casa de vegetação. Não foi realizado nenhum tratamento adicional.

As pulverizações dos produtos foram realizadas quando as plantas possuíam cerca de 5 folhas em uma única haste, através de pistola de pintura acoplada a um compressor com pressão de 50 libras, até o ponto de gotejamento. Cada parcela experimental foi composta por 1 vaso contendo uma planta.

A partir de folhas com lesões esporulantes de sarna coletadas de macieiras mantidas na estação experimental da EPAGRI de São Joaquim, foi preparada a suspensão de esporos (3×10^5 esporos.mL⁻¹) utilizada na inoculação das mudas. Para isso, as mudas foram pulverizadas com a suspensão de esporos e posteriormente dispostas em câmara de nevoeiro por 48 horas, com temperatura de 18°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). Após esse período, as plantas foram recolocadas em casa de vegetação. A severidade da doença em todos os experimentos foi avaliada aos 14 dias após a inoculação, nas 5 folhas apicais de cada planta, utilizando-se a escala de notas de Croxall et al. (1952), onde 0 é a nota da folha sem sintomas da doença, e 1, 2, 3, 4 ou 5, são notas atribuídas às folhas com severidade igual ou inferior à 1%, 5%, 10%, 25% e 50% respectivamente; nota 6 é atribuída às folhas com severidade acima de 50%. Posteriormente, as notas foram transformadas para índice de doença pela fórmula de Townsend & Heuberger (1943):

$$\text{ID} = \sum[(g.nf).100]/N.V$$

sendo: ID= índice de doença da planta; g= grau de infecção na escala de 1-6; nf=número de folhas com essa nota na parcela; N=valor da maior nota da parcela; V=total de folhas avaliadas na parcela.

Inicialmente, para verificar o efeito protetor dos produtos sobre a sarna da macieira, as mudas foram pulverizadas com água destilada,

quitosana (2 e 5 mg.mL⁻¹), polissacarídeo de babosa (2 mg.mL⁻¹), SBSC e FASC (25 mg.mL⁻¹) ou fosfito de potássio (2 µL.mL⁻¹), aos 3 ou 7 dias antes da inoculação do patógeno. Esse experimento contou com 4 repetições por tratamento.

No segundo experimento, realizado entre os meses de outubro e dezembro de 2009, as mudas de macieira foram pulverizadas com água destilada, quitosana (5 mg.mL⁻¹) ou fosfito de potássio (2 µL.mL⁻¹) e, 7 dias depois, inoculadas do agente causal da sarna. Nesse experimento, duas folhas suscetíveis e duas folhas resistentes à sarna foram coletadas a partir de cada muda, aos 3, 7, 9, 11 ou 13 dias após a pulverização, dispostas em papel alumínio e armazenadas a -80 °C, até o momento das análises bioquímicas. Como padrão de folha suscetível, foram coletadas folhas jovens, situadas no ápice caulinar, enquanto como padrão resistente, foram amostradas aquelas situadas imediatamente abaixo, mas que já se encontravam completamente expandidas. Nesse caso, para cada tratamento foram realizadas 6 repetições.

No terceiro experimento, realizado entre outubro e novembro de 2010, as mudas foram pulverizadas com água destilada, quitosana (5 mg.mL⁻¹) ou fosfito de potássio (2 µL.mL⁻¹), e 7 dias depois inoculadas com *V. inaequalis*. Nesse ensaio, cada unidade experimental foi composta por 3 plantas, sendo que de cada planta foi coletada uma amostra de três folhas suscetíveis e três folhas resistentes, totalizando então nove folhas suscetíveis e nove resistentes por repetição, sendo cada tratamento composto por 6 repetições. As coletas foram realizadas aos 3, 7 e 9 dias após a pulverização, sendo as folhas colocadas imediatamente em nitrogênio líquido, e posteriormente armazenadas a -80 °C. No mesmo experimento, foram mantidas seis mudas por tratamento, das quais não foram realizadas coletas de folhas, para avaliação da severidade da doença.

2.4.3. Ativação de mecanismos de defesa em folhas de maçã

Para a avaliação do efeito dos produtos quanto à ativação de mecanismos de defesa em folhas de macieira suscetíveis e resistentes à sarna, as amostras embrulhadas em papel alumínio foram transportadas imersas em nitrogênio líquido até o Laboratório de Fitopatologia, CCA/UFSC, em Florianópolis, SC, onde foram processadas.

2.4.3.1. Determinação das atividades de peroxidases e β -1,3 glucanases

Uma amostra de 200 mg de folhas foi macerada na presença de nitrogênio líquido e posteriormente homogeneizada em 1,5 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0), contendo fluoreto de fenilmetanosulfonil (1 mM), polivinilpirrolidona (0,5% m/v), e ácido etilenodiamino tetra-acético (1 mM). Os homogenatos foram dispostos em microtubos de 2 mL, e centrifugados a 20.000 g por 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi coletado, constituindo assim o extrato protéico da amostra.

A atividade de peroxidases foi mensurada a partir da reação que consistiu de 45 μ L do extrato protéico, adicionados em 2,55 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo guaiacol (0,25% v/v) e peróxido de hidrogênio (0,1 M), a 40 °C. A reação foi conduzida por 4 min, anotando-se os valores de absorbância em espectrofotômetro (Femto 700 Plus®) a 470 nm, em intervalos de 30 segundos, a partir do primeiro minuto de reação. Os resultados foram expressos em unidades de densidade óptica a 470nm por minuto por mg de proteína ($\text{DO}_{470\text{nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$).

A atividade de enzimas glucanases foi avaliada após a reação por uma hora de 40 μ L do extrato protéico adicionado em 460 μ L de tampão acetato 100 mM (pH 5,0), contendo laminarina a 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, a 44 °C. Para cada amostra foi realizado um branco, o qual continha todos os reagentes em mesmas quantidades, com exceção da laminarina. Depois desse período, os açúcares redutores foram quantificados pelo método de Lever (1972), onde 500 μ L (40 μ L do incubado em 460 μ L de tampão acetato 100 mM) foram submetidos por 5 min a 100 °C, na presença de 1,5 mL de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico 1% (m/v) em NaOH 0,5 M, interpolando-se os valores de absorbância em uma curva padrão de glucose (0-50 $\mu\text{g/mL}$). A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se como padrão a albumina de soro bovino (0-20 μg). Os resultados foram expressos em μkatal de glucose formado a partir da hidrólise da laminarina por mg de proteína ($\mu\text{katal} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$).

2.4.3.2. Flavonóides

A quantificação de flavonóides totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Woisky & Salatino (1998). Para isso, 250 mg de tecido foliar de macieira foram macerados na presença de nitrogênio líquido, acrescentado-se em seguida 3 mL de metanol 80% acidificado com HCl (80:1 v/v). A extração ocorreu pelo período de 1 hora, no escuro, em temperatura ambiente. Após esse período, o incubado foi filtrado em papel filtro Qualy®, com poros de 14 μm de diâmetro. A reação para quantificação do teor de flavonóides foi conduzida a partir de 0,5 mL do extrato em metanol acidificado, o qual foi adicionado em 2,5 mL de etanol 99% e 0,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 2% (m/v). Após a homogeneização em vórtex, o homogenato foi mantido no escuro por 1 hora. Os valores de absorbância a 420 nm foram lidos em espectrofotômetro, e os resultados interpolados em uma curva-padrão de quercetina e representados em μg de equivalente de quercetina por grama de matéria fresca ($\mu\text{g EQC.g MF}^{-1}$).

2.4.3.3. Compostos fenólicos totais

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais nas folhas de macieira, utilizou-se o método de McCue et al. (2000), com adaptações. A reação para quantificação de compostos fenólicos totais foi conduzida acrescentado-se 0,5 mL do extrato de folhas obtido no item 2.4.3.2., em 0,5 mL de metanol 95%, agitando-se em seguida em vórtex. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de etanol 95% (v/v), 1 mL de água destilada estéril, e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau, homogeneizando-se a mistura em vórtex. Após 5 minutos, adicionou-se 0,5 mL de Na_2CO_3 (5% m/v), misturou-se novamente em vórtex, e conduziu-se a reação, no escuro, pelo período de 1 hora, sob temperatura ambiente. Após esse período, a absorbância do incubado foi mensurada em espectrofotômetro a 725 nm, e os valores interpolados em uma curva padrão de ácido gálico (0-75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os resultados foram apresentados em μg de equivalentes de ácido gálico por grama de matéria fresca ($\mu\text{g EAC.g MF}^{-1}$).

2.4.4. Efeito dos produtos sobre a germinação de esporos de *Venturia inaequalis*

A avaliação de quitosana e fosfito de potássio sobre a germinação de esporos de *V. inaequalis* foi conduzida no Laboratório de Fitopatologia da UFSC.

Os esporos de *V. inaequalis* foram obtidos de folhas sintomáticas de macieira coletadas na estação experimental da EPAGRI/São Joaquim. Elas foram agitadas vigorosamente em um frasco de vidro contendo água destilada. A suspensão de esporos, após filtrada em duas camadas de gaze, foi diluída até a concentração de 5×10^5 esporos.mL⁻¹, determinada com um hemacitômetro.

Em lâminas escavadas, 20 µL dos tratamentos foram adicionados a 20 µL da suspensão de esporos. As diluições foram preparadas de modo que a concentração final de quitosana fosse 0, 125, 250, 500 ou 1000 µg.mL⁻¹, e do fosfito de potássio 0; 0,625; 1,25; 2,5 ou 5 µL.mL⁻¹. As lâminas foram dispostas no interior de placas de Petri, sob alta umidade relativa, e incubadas a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Após 48 horas, a germinação foi avaliada em 100 esporos, em microscópio óptico, considerando como germinados aqueles esporos que possuíam o tubo germinativo superior ao seu maior comprimento, conforme El Ghaouth et al. (1994). O experimento contou com 5 repetições por tratamento.

2.4.5. Delineamento experimental e análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental completamente casualizado. A homogeneidade das variâncias foi testada pelo teste de Bartlett a 5% de probabilidade, e quando não satisfeita, procedeu-se a transformação dos dados para \sqrt{x} ou Log x. Posteriormente, realizou-se a análise de variância e o teste F a 5% de significância. Nos experimentos com parâmetros qualitativos, aplicou-se o teste de separação de média de Student-Newman-Keuls (SNK). Para aqueles onde foram testadas diferentes doses de produtos, desdobrou-se a análise de variância para a regressão linear.

2.5. RESULTADOS

2.5.1. Efeito protetor sobre a sarna da macieira

Através da análise em esquema bifatorial 7 x 2 dos resultados obtidos com o experimento realizado em 2009, constatou-se que a aplicação de fosfito de potássio diminuiu a severidade da sarna em mais de 86% em comparação à testemunha. Não houve diferença estatística entre a aplicação aos 3 ou 7 dias antes da inoculação, assim como não houve interação entre os dois fatores (produtos x tempo). Apesar de não diferir estatisticamente da testemunha, a severidade média da doença nas plantas pulverizadas com quitosana (2 ou 5 mg.mL⁻¹) foi 18% e 29% menor, respectivamente, enquanto aquelas que receberam a aplicação de FASC apresentaram severidade 29% menor que a da testemunha (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito de quitosana, FPPRB, FASC, SBSC ou fosfito de potássio sobre a severidade da sarna em folhas de macieira no ano de 2009. As mudas foram tratadas aos 7 ou 3 dias antes da inoculação (d.a.i.) de *Venturia inaequalis**

Tratamento	Dose	Intervalo de tempo (d.a.i.)		Média
		3	7	
		Índice de doença		
Água destilada	-	62	53	⁽⁴⁾ 58 a
Quitosana	2 mg.mL ⁻¹	48	46	47 a
Quitosana	5 mg.mL ⁻¹	46	36	41 a
FPPRB ⁽¹⁾	2 mg.mL ⁻¹	57	53	55 a
FASC ⁽²⁾	25 mg.mL ⁻¹	35	47	41 a
SBSC ⁽³⁾	25 mg. mL ⁻¹	52	49	51 a
Fosfito de potássio	2 uL mL ⁻¹	1	16	8 b

*Dados obtidos a partir da EPAGRI-São Joaquim.

⁽¹⁾ Fração polissacarídica do parênquima de reserva da babosa

⁽²⁾ Filtrado obtido a partir da suspensão autoclavada de fermento à base de *Saccharomyces cerevisiae*

⁽³⁾ Suspensão bruta de fermento à base de *Saccharomyces cerevisiae*

⁽⁴⁾ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de SNK a 5% de probabilidade.

No experimento realizado no ano de 2010, foi verificado que somente a pulverização de fosfito de potássio a $2 \mu\text{L.mL}^{-1}$ resultou em controle significativo da doença (Figura 6).

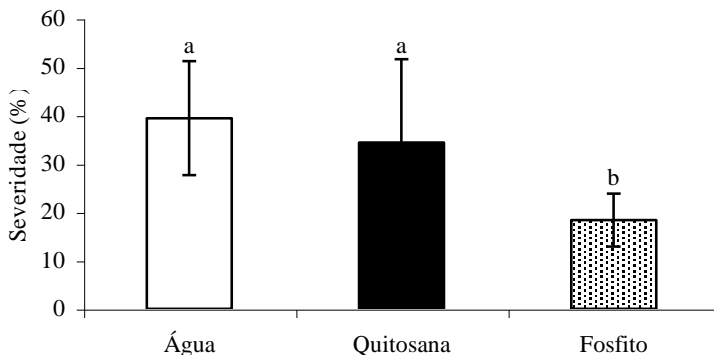


Figura 6. Efeito de quitosana 5 mg.mL^{-1} ou fosfito de potássio $2 \mu\text{L.mL}^{-1}$ sobre a severidade da sarna em folhas de macieira no ano de 2010. As mudas foram tratadas com os produtos 7 dias antes da inoculação com *Venturia inaequalis*. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de SNK a 5% de probabilidade. Análise estatística a partir dos dados transformados para \sqrt{x} . Dados obtidos a partir da EPAGRI-São Joaquim.

2.5.2. Efeito dos produtos na ativação dos mecanismos bioquímicos da planta

Nos resultados do experimento realizado no ano de 2009, observou-se através da análise dos dados em esquema trifatorial ($4 \times 5 \times 2$), que as folhas resistentes à sarna da macieira apresentaram maior atividade de enzimas peroxidases em relação às suscetíveis (Figura 7A). Não houve diferença na atividade dessa enzima entre as plantas pulverizadas com os diferentes produtos, assim como não houve diferenças no decorrer do tempo. A atividade de enzimas glucanases não diferiu em nenhum dos tratamentos, e nos tempos avaliados (Figura 7B).

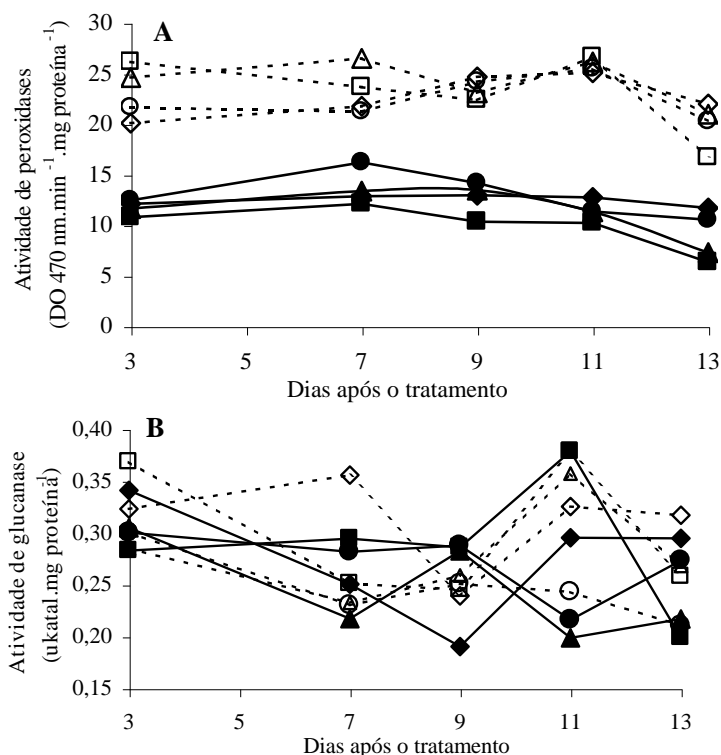


Figura 7. Atividade de peroxidases (A) e β -1,3 glucanases (B) em folhas de macieira, suscetíveis (símbolos cheios) e resistentes (símbolos vazios) à sarna, pulverizadas com água destilada (\bullet, \circ); quitosana 5 mg.mL^{-1} ($\blacktriangle, \triangle$), fosfito de potássio $2 \text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$ (\blacklozenge, \lozenge) ou FASC (\blacksquare, \square), no ano de 2009. As mudas foram tratadas 7 dias antes da inoculação com *Venturia inaequalis*. Houve diferença significativa entre folhas suscetíveis e resistentes em A pelo teste de F a 1% de probabilidade. Análise estatística a partir dos dados transformados para Log x.

A análise da atividade de enzimas peroxidases do experimento realizado em 2010 demonstrou novamente que essa é maior nas folhas resistentes à sarna do que nas suscetíveis (Figura 8A). A atividade da enzima diminuiu aos 7 dias após a pulverização dos tratamentos nas folhas resistentes. Em relação à atividade de β -1,3 glucanases, como no experimento do ano anterior, não houve diferença entre os tipos de folhas, entre os produtos testados e nos tempos avaliados (Figura 8B).

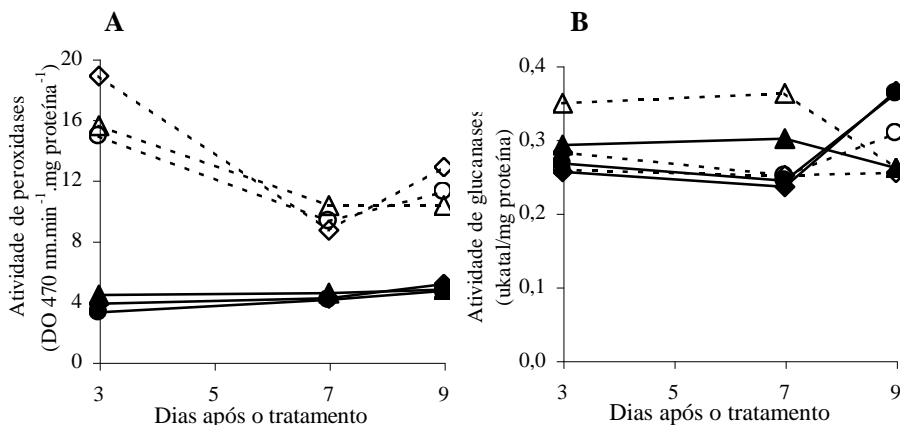


Figura 8. Atividade de peroxidases (A) e β -1,3 glucanases (B) em folhas de macieira, suscetíveis (símbolos cheios) e resistentes (símbolos vazios) à sarna, pulverizadas com água destilada (●,○); quitosana 5 mg.mL⁻¹ (▲,△) ou fosfito de potássio 2 μL.mL⁻¹ (◆,◇), no ano de 2010. As mudas foram tratadas 7 dias antes da inoculação com *Venturia inaequalis*. Houve diferença significativa entre folhas suscetíveis e resistentes em A pelo teste de F a 1% de probabilidade.

O teor de flavonóides diferiu estatisticamente entre folhas resistentes e suscetíveis, sendo que as primeiras apresentaram menores quantidades. Em relação aos diferentes produtos, as plantas que receberam a aplicação de fosfito de potássio apresentaram menor teor de flavonóides nas folhas suscetíveis à sarna. Porém, em relação às folhas resistentes à doença, foram aquelas que receberam a aplicação de quitosana que apresentaram menor teor de flavonóides (Figura 9).

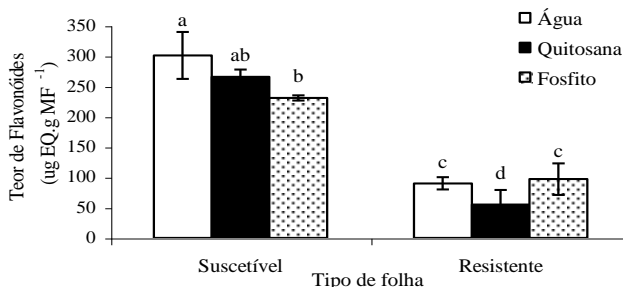


Figura 9. Teor de flavonóides em folhas de macieira, suscetíveis e resistentes à sarna, 7 dias após o tratamento com água destilada, quitosana 5 mg.mL⁻¹ ou fosfito de potássio 2 µL.mL⁻¹, imediatamente antes da inoculação com *Venturia inaequalis*. Houve interação entre os fatores "tipo de folha" e "produto", pelo teste de F a 1 % de probabilidade. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de SNK a 5 % de probabilidade. Análise estatística a partir dos dados transformados para \sqrt{x} .

A quantidade de compostos fenólicos totais não foi diferente entre as plantas pulverizadas com água, quitosana ou fosfito de potássio, assim como não houve diferença entre folhas suscetíveis e resistentes à doença e ao longo dos tempos avaliados (Figura 10).

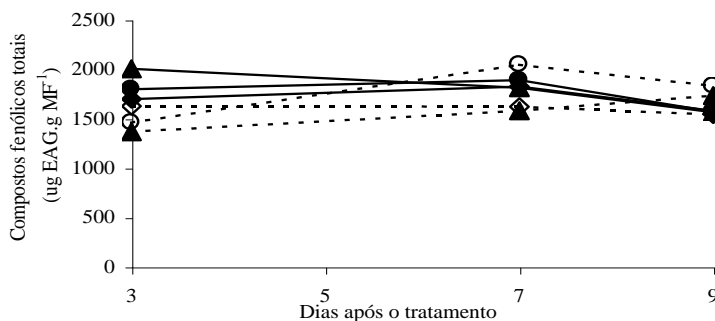


Figura 10. Teor de compostos fenólicos totais em folhas de macieira, suscetíveis (símbolos cheios) e resistentes (símbolos vazios) à sarna, pulverizadas com água destilada (●,○); quitosana 5 mg.mL⁻¹ (▲,△) ou fosfito de potássio 2 µL.mL⁻¹ (◆,◇). As mudas foram pulverizadas 7 dias antes da inoculação com *Venturia inaequalis*. Não houve diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de F a 5% de probabilidade.

2.5.3. Germinação de esporos de *Venturia inaequalis*

Fosfito de potássio e quitosana reduziram a porcentagem de germinação de esporos do fungo *V. inaequalis*. No caso da quitosana, a germinação foi reduzida com o aumento da concentração de forma linear, e a dose de 1 mg.mL^{-1} do polissacarídeo inibiu em 49% a germinação (Figura 11A). Em relação ao fosfito de potássio, houve efeito quadrático de doses sobre a germinação, de acordo com o teste de F a 5% de probabilidade. Nesse caso, a máxima inibição foi de 13%, obtida com a dose $2,5 \text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$ de fosfito (Figura 11B).

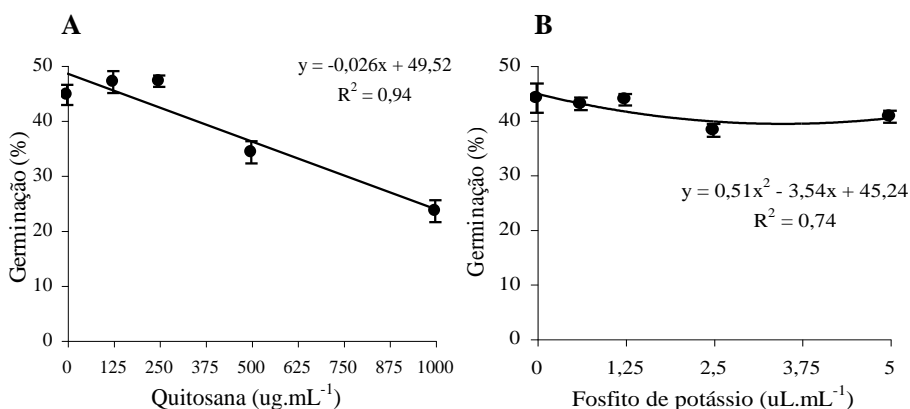


Figura 11. Germinação de esporos de *Venturia inaequalis*, em diferentes doses de quitosana (A) ou de fosfito de potássio (B), após 48 horas de incubação em fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. Houve efeito de doses para quitosana e fosfito de potássio, pelo teste de F a 1 % de probabilidade.

A partir da dose de $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de quitosana, foram observados danos no tubo germinativo de *V. inaequalis*, os quais se apresentavam mais espessos e atrofiados (Figura 12B) em relação aos esporos que germinaram na água (Figura 12A) ou em fosfito de potássio (Figura 12C).

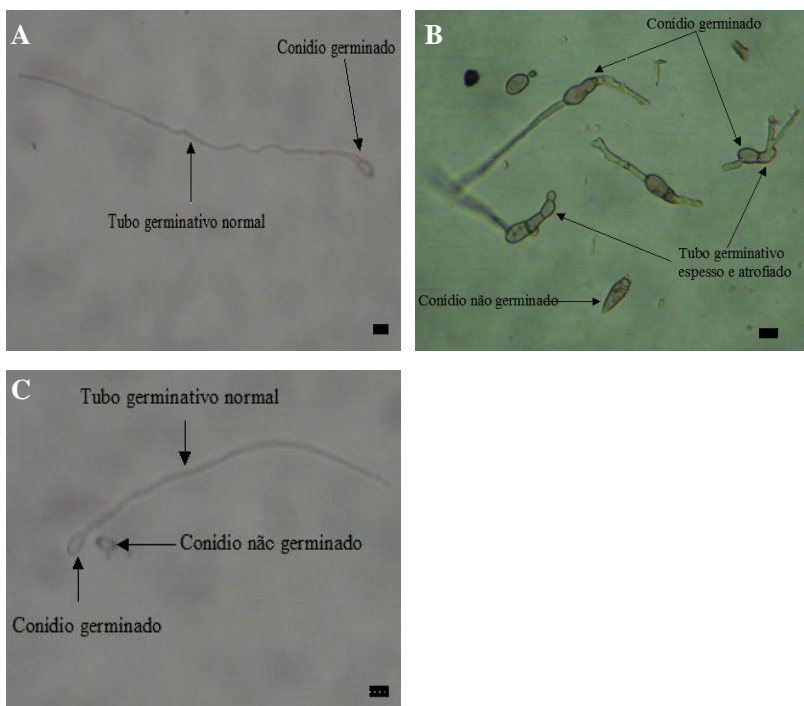


Figura 12. Germinação de esporos de *Venturia inaequalis* na presença de água destilada (A), quitosana 500 µg.mL⁻¹ (B) ou fosfito de potássio a 5 µL.mL⁻¹ (C) após 48 horas de incubação em fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C±1. Observam-se tubos germinativos defeituosos dos esporos germinados em suspensão de quitosana. Barra = 10 µm.

2.6. DISCUSSÃO

Os resultados dos experimentos realizados em casa de vegetação no ano de 2009 e 2010 demonstraram que a pulverização de fosfito de potássio a 2 µL.mL⁻¹ reduziu a severidade da sarna da macieira em 86% e 53%, respectivamente.

A redução da sarna da macieira pela utilização de fosfito de potássio já foi demonstrada anteriormente. Boneti & Katsurayama (2002) obtiveram maior redução da severidade da sarna em casa de vegetação quando a solução de fosfito de potássio (2 µL.mL⁻¹) foi aplicada 7 dias antes da inoculação. No presente estudo, o controle da

sarna através da aplicação de fosfito no mesmo intervalo de tempo foi confirmado, porém não diferiu da aplicação 3 dias antes da inoculação. Percival et al. (2009) observaram redução da severidade da sarna da macieira em 35%, e da sarna da pereira (*V. pirina*) em 28% , após a aplicação de produto comercial à base de fosfito na concentração de 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, em ensaios de campo. A eficiência foi maior quando o produto foi pulverizado durante quatro estágios de desenvolvimento da cultura, desde a brotação até próximo à colheita.

O controle de doenças pela aplicação preventiva de fosfitos está reportado na literatura, com destaque para doenças causadas por oomicetos. Em sistemas de cultivo hidropônico, o tombamento de plântulas de pimenta (*Capsicum annum*) causado por *Phytophthora capsici* foi controlado quando foi utilizado fosfito comercial como fonte de fósforo na solução nutriente (FÖRSTER et al., 1998). Dianese et al. (2009) obtiveram controle de *P. palmivora*, agente causal do mal-do-pé em mamoeiro (*Carica papaya*), aplicando-se preventivamente diferentes formulações de fosfitos na água de rega, porém maior controle ocorreu quando o produto foi pulverizado na parte aérea. O controle de podridão do colo (*Phytophthora cactorum*) em pós-colheita de morango foi divulgado por Rebollar-Alviter et al. (2010) através de pulverizações preventivas de fosfito de potássio nas plantas.

Como um dos possíveis modos de ação de fosfitos no controle de doenças de plantas, indica-se que o sal possa sequestrar cálcio no local da aplicação, e isso desencadeie mecanismos de defesa sistêmicos (GOTTSTEIN & KUC', 1989). Daniel & Guest (2006) estudando as respostas de *Arabidopsis thaliana* quando desafiada por *Phytophthora palmivora*, após a aplicação de fosfito de potássio, demonstraram que aquelas que receberam a aplicação do produto apresentavam a parede celular mais espessa e deposição de calose no sítio de infecção, além do acúmulo de compostos fenólicos. Sabe-se que os fenólicos podem originar compostos relacionados aos mecanismos de defesa, como lignina e fitoalexinas (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

A partir dos resultados do primeiro experimento, foi realizado um novo experimento no mesmo ano (2009) para verificar se a pulverização de fosfito de potássio a 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, quitosana a 5 mg. mL^{-1} ou FASC a 25 mg. mL^{-1} , 7 dias antes da inoculação, modificaria a atividade de enzimas peroxidases e β -1,3 glucanases, tentando-se estabelecer um papel para as mesmas no patossistema sarna-macieira.

Não houve diferença na atividade enzimática em folhas de mudas de macieira que receberam os produtos em comparação com

aquelas pulverizadas com água destilada. Porém, no caso da atividade de peroxidases, as folhas resistentes à sarna exibiram maior atividade enzimática em todos os tempos de coleta.

Os resultados deste estudo se assemelham, em parte, àqueles obtidos por Ribeiro et al. (2006), quando os autores utilizaram fosfito de potássio para o controle de murcha de *Verticillium* em mudas de cacaueiro, e o produto não elevou a atividade de enzimas peroxidases. Porém, diferentemente dos nossos resultados, os autores não obtiveram controle da doença utilizando a dose de $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$.

A ineficiência do fosfito em elevar a atividade de enzimas peroxidases e a maior atividade enzimática em folhas resistentes à sarna foram corroborados através dos resultados do experimento em casa de vegetação realizado no ano de 2010, quando fosfito, quitosana e água foram pulverizados 7 dias antes da inoculação. Novamente, não houve diferença na atividade enzimática de β -1,3 glucanases nas plantas que receberam os produtos e também entre folhas resistentes e suscetíveis à doença.

As enzimas peroxidases estão envolvidas na eliminação de algumas espécies reativas de oxigênio (ERO) que, quando em excesso, podem causar danos à célula. Essas EROs podem ser produzidas em decorrência de uma situação de estresse para a planta, como o processo de infecção por um fitopatógeno, podendo atuar diretamente sobre o fungo, e ao mesmo tempo, destruir a célula e impedir que a infecção se estenda pelo tecido da planta, em uma resposta à infecção conhecida como reação de hipersensibilidade (RH) (RESENDE et al., 2003). A RH em macieira resistente à *V. inaequalis* foi relatada por Nicholson et al. (1977), os quais acompanharam o processo de infecção pelo patógeno. A germinação de esporos e a formação de apressórios ocorreram de maneira quase idêntica em cultivares suscetíveis e resistentes, porém nas folhas das macieiras resistentes, com frequência aconteceu granulação citoplasmática nas células da epiderme, sob o sítio de infecção, e em até 26 horas após o início do processo, a célula entrou em colapso e morreu, em decorrência da RH. Quando o patógeno conseguiu penetrar nos espaços intercelulares, as hifas primárias de infecção se desenvolveram muito pouco nas plantas resistentes, porém nas suscetíveis, o desenvolvimento do patógeno aconteceu ininterruptamente.

No entanto, através do presente estudo não houve indícios para inferir se a resistência à doença nas folhas velhas está relacionada com a RH, pois mesmo antes da inoculação do patógeno os níveis enzimáticos já eram constitutivamente superiores aos das folhas jovens suscetíveis, e

a atividade de peroxidases não se elevou nos tempos que suscederam a inoculação.

As enzimas peroxidases estão relacionadas também ao processo de enrigecimento das paredes celulares, oxidando o ácido ferúlico a diferúlico, o qual une ácido cinâmico às cadeias de hemicelulose e proteínas de parede, ou ainda podem atuar na polimerização de álcoois para a formação de lignina (GASPAR et al., 1982; KERBAUY, 2008). Assim, sugere-se que a maior atividade de peroxidases possa atuar indiretamente na defesa da planta, catalizando reações que resultam em produção de substâncias que conferem maior resistência mecânica ao tecido, dificultando consequentemente a infecção das folhas mais velhas da macieira pelo agente causal da sarna.

Li & Xu (2002), estudando a resistência ontogênica em folhas com diferentes idades em macieira de uma cultivar suscetível à sarna, demonstraram que o crescimento do micélio do fungo nas folhas adultas da planta é mais lento e não são observados sintomas visuais da doença, enquanto que nas folhas jovens do ápice caulinar, o fungo se desenvolve mais intensamente. O efeito da resistência ontogênica sobre o crescimento micelial de *V. inaequalis* se assemelha então à resistência genética apresentada por algumas cultivares que dificultam o desenvolvimento fúngico no interior do tecido da planta.

Em eucalipto, ocorre resistência ontogênica nas folhas em relação à infecção de *Puccinia psidii*, agente causal da ferrugem (BOAVA et al., 2010). Souza (2008), avaliando características anatômicas de folhas de eucalipto resistentes à ferrugem devido à ontogenia, verificou maior espessura de cutícula e de parênquima paliçádico, o qual devido à característica de ser formado por células com união coesa, poderia dificultar a infecção pelo patógeno.

Além de apresentarem maior atividade de enzimas peroxidases, as folhas resistentes à doença também exibiram menor teor de flavonóides. Dentro da classe dos flavonóides está a fitoalexina floridizina, uma diidrochalcona que quando degradada a ácido florético e a ácido *p*-hidroxibenzóico atua diretamente contra a infecção de *V. inaequalis* (MIKULIC PETKOVSEK et al., 2009). Leser & Treutter (2005) indicam que a presença de floridizina e flavonóides é tida como fundamental na resistência da macieira a *V. inaequalis*, porém Hrazdina (2003) ao comparar folhas jovens de macieira suscetíveis à sarna com folhas velhas resistentes constatou que as suscetíveis à doença apresentavam maior teor de floridizinas em relação às folhas resistentes, tanto antes quanto após a inoculação do fitopatógeno. A partir dos

resultados obtidos no presente trabalho, tem-se mais um indicativo de que moléculas pertencentes ao grupo dos flavonóides não exercem um papel fundamental na resistência à sarna nas folhas velhas de macieira, visto que seus níveis são inferiores quando comparados com as folhas suscetíveis.

No entanto, quando receberam a aplicação de fosfito de potássio, as folhas jovens suscetíveis à sarna tiveram seu teor de flavonóides diminuído, enquanto que a quantidade de compostos fenólicos totais não foi alterada pela aplicação dos produtos, não diferindo também entre folhas suscetíveis e resistentes à doença, e nos tempos avaliados. Isso indica que as folhas de macieira suscetíveis à sarna que receberam a aplicação de fosfito se aproximaram um pouco de características das folhas resistentes, as quais notadamente possuem menor teor de flavonóides, e concomitante a isso, apresentaram menor severidade da doença. A diminuição no teor de flavonóides propiciada pela aplicação do fosfito nas folhas suscetíveis poderia sugerir a ativação de complexos enzimáticos que convertessem esses compostos em substâncias com maior poder antifúngico, contribuindo para a redução da severidade da sarna. Essa abordagem e a análise de outros mecanismos de defesa vegetal necessitam de maiores estudos para se atribuir ao fosfito um papel como indutor de resistência no patossistema em questão.

Os nutrientes afetam a taxa de desenvolvimento e a capacidade das plantas se defenderem contra fitopatógenos. O fósforo pode melhorar o balanço de nutrientes da planta, e acelerar seu desenvolvimento. Para patossistemas onde a infecção ocorre nas folhas jovens, como é o caso da sarna da macieira, essa estratégia diminuiria o tempo em que o tecido fica vulnerável à doença. O potássio, por sua vez, incrementa a resistência do tecido contra ferimentos, e quando este ocorre, a cicatrização é mais rápida (AGRIOS, 2005).

Tanto o fósforo quanto o potássio são dois macronutrientes e ambos são os principais compostos do produto que reduziu a severidade da sarna nesse trabalho. Dessa maneira, surge a hipótese do fosfito de potássio reduzir a intensidade da doença por acelerar o desenvolvimento das folhas, restringindo o tempo em que elas são suscetíveis ao fungo. Contudo, sua utilização como fonte dos macronutrientes P e K é questionada desde a década de 1950, quando demonstrou-se que altas doses de fosfito prejudicam o desenvolvimento de plantas jovens (MACINTIRE et al., 1950).

Um dos possíveis mecanismos na utilização de fosfitos como fonte de P seria de maneira indireta, através da oxidação prévia da molécula a fosfato por bactérias que habitam o solo, como demonstrado pelos estudos de Metcalf & Wolf (1998) com *Pseudomonas stutzeri*. Mas isso é um processo demorado e não representaria uma fonte significativa de P a curto prazo. Por outro lado, plantas de soja tratadas com fosfito de potássio apresentaram maior índice de área foliar (SILVA et al., 2011), no entanto, esse efeito pode estar mais relacionado ao controle do míldio da soja (*Peronospora manshurica*) observado pelos autores do que a um possível efeito nutricional do fosfito.

Ratjen & Gerendás (2009) compararam a utilização de fosfito de potássio com a de fosfato como fonte de P para plantas de abóbora (*Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo* convar. *giromontina*, cv. Diamant F1), através de pulverização foliar ou pela adição ao solo. As plantas com deficiência de fósforo absorveram fosfito e o acumularam nas folhas jovens em altas concentrações, porém não o metabolizaram para a utilização como nutriente, pois tiveram seu desenvolvimento prejudicado quando comparadas àquelas que receberam a aplicação de fosfato.

Em condição de limitação de fósforo, as plantas respondem ao estresse com o crescimento de raízes e transcrição de genes relacionados aos transportadores de fósforo na célula. Com a suplementação na forma de fosfito, sugere-se que esse atue analogamente ao fósforo na sinalização de rotas metabólicas, suprimindo respostas da planta ao estresse, porém, como não se trata de uma fonte real de fósforo, por não ser oxidado a fosfato pelo vegetal, resulta em efeitos deletérios (THAO & YAMAKAWA, 2009).

Smille et al. (1989), após aplicarem fosfito de potássio no solo, verificaram que plântulas de tremoço (*Lupinus angustifolius* cv. 'Unicrop') apresentaram menor comprimento de lesão causada por *P. cinnamomi*, e que as concentrações de fosfito no tecido da planta foram próximas às que causaram redução do crescimento micelial em testes *in vitro* (250 µg.mL⁻¹). Os autores também demonstraram que a planta pode armazenar em seu tecido fosfito de potássio em concentrações superiores à da solução aplicada.

A concentração de sais de fosfito nas partes jovens da planta é apontada como forma de controle de fitopatógenos que são afetados diretamente pelo sal. Ouimette & Coffey (1989) demonstraram que mudas de abacateiro tratadas com solução de fosfito de potássio, tanto via solo quanto pela aplicação foliar, apresentaram acúmulo do sal nas

folhas uma semana depois, e a partir da segunda semana, também nas folhas jovens que brotaram após a aplicação. Esse acúmulo ocorreu de forma semelhante ao tratamento que recebeu aplicação de Fosetyl-Al ($C_2H_7O_3P$), um fungicida sistêmico translocado via floema e xilema, que quando convertido a fosfito apresenta ação direta sobre alguns patógenos.

Nessa perspectiva, buscou-se avaliar o efeito direto do fosfito de potássio sobre o agente causal da sarna. Apesar da constatação do efeito de doses através da análise estatística, a germinação de esporos de *V. inaequalis* foi pouco afetada nas doses de fosfito testadas, sendo que a $2,5 \mu L.mL^{-1}$, dose próxima à utilizada nas plantas, a germinação média foi 13% menor em relação ao controle, não aumentando seu efeito ao aumentar a concentração para $5 \mu L.mL^{-1}$. Boneti & Katsurayama (2002) já haviam demonstrado que a germinação de *V. inaequalis* não foi diminuída por fosfito de potássio na dose de $5 \mu L.mL^{-1}$. Apesar do pequeno efeito sobre a germinação de *V. inaequalis*, o adubo foliar é relatado afetando diretamente o seu crescimento micelial em mais de 68% quando adicionado ao meio de cultura na dose de $3 \mu L.mL^{-1}$ (BONETI & KATSURAYAMA, 2002).

Ainda, através dos testes *in vitro*, pode-se constatar que os esporos incubados na presença de quitosana apresentaram menor porcentagem de germinação, e seu efeito foi linearmente relacionado com o aumento da dose até $1000 \mu g.mL^{-1}$. Nas doses de $500 \mu g.mL^{-1}$ e $1000 \mu g.mL^{-1}$, foram observadas alterações morfológicas no tubo germinativo, o qual se apresentou mais espesso e atrofiado. O efeito antifúngico ou fungistático da quitosana já foi divulgado na literatura sobre fungos fitopatogênicos como *Pythium aphanidermatum*, *Rhizopus stolonifer* e *Colletotrichum acutatum* (EL GHAOUTH et al., 1992, 1994). No entanto, a sensibilidade dos patógenos ao polissacarídeo é variada. Felipini & Di Piero (2009) estudando o efeito da quitosana sobre *C. acutatum* demonstraram efeito fungistático do produto com uma dose 10 vezes menor ($100 \mu g.mL^{-1}$), e alterações morfológicas no tubo germinativo do patógeno a partir da dose de $50 \mu g.mL^{-1}$. Liu et al. (2007) verificaram que tanto a germinação de *P. expansum* quanto a de *B. cinerea* são reduzidas na presença de quitosana, e o polissacarídeo afetou a integridade da membrana plasmática dos dois fungos, com maior efeito sobre *P. expansum*. Porém, quando a quitosana é acrescentada ao meio de cultura, o crescimento micelial de *B. cinerea* é o mais atingido. No trabalho desenvolvido por El Ghaouth et al. (1994), quitosana causou danos à parede celular de *P. aphanidermatum*, e

desintegração propoplasmática. Sugere-se que a ação da quitosana é devida às interações de cargas positivas na sua cadeia com cargas negativas de resíduos de macromoléculas, expostas na superfície das células fúngicas, que resultam em alterações na permeabilidade da membrana (BENHAMOU, 1992).

Assim, evidencia-se que a sensibilidade dos fitopatógenos à quitosana e ao fosfito de potássio muda com as diferentes espécies e estágios de desenvolvimento. *V. inaequalis* demonstrou ser mais afetada durante o processo de germinação por quitosana do que por fosfito de potássio.

Tento em vista os resultados aqui discutidos, podemos concluir que apesar de não ter alterado a atividade das proteínas-RP peroxidases e β -1,3 glucanases, e o efeito direto sobre a germinação do agente causal da sarna da macieira ter sido baixo, o fosfito de potássio controlou a doença quando aplicado preventivamente.

O melhor intervalo de tempo foi o de 7 dias, pois caso os resultados sejam extrapolados para uma situação de campo, maiores intervalos de tempo para pulverização são mais interessantes, pois o número total de aplicações no final do ciclo seria reduzido se comparado a aplicação em intervalos menores.

É importante considerar que outros modos de atuação do fosfito podem estar influenciando no controle da doença, porém mais estudos necessitariam ser realizados envolvendo mecanismos estruturais de defesa ou mesmo outras enzimas-RP e produtos do metabolismo secundário que podem ter sido elicitados pelo produto.

O tempo de maturação da folha pela aplicação do suposto adubo foliar também poderia ser alvo de estudos mais detalhados, pois como discutido anteriormente, quanto mais rápida a maturação fisiológica das folhas, menor o tempo em que há tecido vulnerável para a infecção do patógeno. Em relação à quitosana, não houve controle significativo da sarna, porém ficou evidente que o polissacarídeo pode afetar diretamente o patógeno, durante o processo de germinação, mesmo em doses baixas. Portanto, novas pesquisas que visem explorar esse efeito de contato sobre o inóculo são sugeridas.

CAPÍTULO 3 – QUITOSANA E ACIBENZOLAR-S-METÍLICO NO CONTROLE DA CERCOSPORIOSE DA BETERRABA E SUAS ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DA PLANTA

3.1. INTRODUÇÃO

A beterraba de mesa (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*) é uma planta de porte herbáceo, e apresenta a raiz tuberosa como o produto de interesse econômico. No Brasil é a 13ª hortaliça mais consumida (MARIMOTO, 1999).

Em Santa Catarina, o cultivo da beterraba ocorre principalmente em propriedades familiares situadas nas imediações da capital do estado, e na região serrana (ICEPA, 2011). As regiões de clima ameno são mais favoráveis ao seu cultivo. Entre os fatores que podem diminuir a produtividade da cultura, encontram-se as doenças fúngicas (FILGUEIRA, 2003).

A cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora beticola*, está amplamente distribuída no mundo, com incidência em todas as regiões dedicadas à cultura da beterraba-açucareira e beterraba-de-mesa. No Brasil, existem registros da doença nos estados do Amapá, Amazonas, Bahia, Minas Gerais, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, no arquipélago de Fernando de Noronha e em várias regiões do Nordeste do país (FILGUEIRA, 2003).

O patógeno *C. beticola* é incide sobre da família Chenopodiaceae, embora existam relatos em hospedeiros de outras famílias, como Malvaceae, Pedaliaceae e Polygonaceae. O fungo sobrevive na forma de conídios ou estromas, principalmente nos restos de cultura infectados deixados no campo após a colheita, nas sementes, assim como em plantas de beterraba voluntárias ou em ervas daninhas hospedeiras. A disseminação a longa distância ocorre através das sementes infectadas ou contaminadas. Dentro da cultura, os conídios são dispersos pelo vento e pelos respingos da água da chuva ou da irrigação por aspersão. Períodos de chuva prolongados, umidade relativa alta e temperaturas entre 25-35 °C são condições que favorecem a infecção e o desenvolvimento da doença (WEILAND & KOCH, 2004).

O controle da doença é realizado principalmente pelo uso de fungicidas protetores e curativos. No Brasil, existem 18 produtos registrados para o controle da doença, sendo 10 desses fungicidas sistêmicos, com efeito pós-infeccional (MAPA, 2011). No entanto, a seleção de isolados de *C. beticola* resistentes a diferentes classes de

fungicidas tem sido relatada na literatura, como o ocorrido com os benzimidazóis e triazóis. Embora a fase sexual de *C. beticola* não esteja ainda descrita, existe grande diversidade entre os isolados, originária de um possível sistema de reprodução ainda desconhecido (IOANNIDIS & KARAOGLANIDIS et al., 2000; WEILAND & HALLOIN, 2001) ou por possíveis mutações somáticas. As principais cultivares de beterraba são suscetíveis à doença. No Brasil, há uma cultivar indicada como resistente à doença, porém carece de relatos científicos. Portanto, há necessidade de se pesquisar medidas alternativas aos fungicidas para o controle da cercosporiose.

A resistência sistêmica adquirida (RSA) é um processo pelo qual plantas previamente tratadas com agentes elicitores se tornam mais resistentes à infecção por patógenos. Em fumo (*Nicotiana tabacum* L. var. Samsun NN), Ross (1961) demonstrou que as plantas previamente desafiadas pelo vírus do mosaico (*Tobacco mosaic virus*) se tornavam mais resistentes a uma segunda inoculação, em partes da planta que não haviam sido desafiadas pelo vírus. Hoje, sabe-se que a RSA pode ser desencadeada por um séries de agentes elicitores bióticos ou abióticos, os quais podem ativar mecanismos de defesa e reduzir a vulnerabilidade das plantas tanto às infecções causadas por vírus, quanto por bactérias (ISHIDA et al., 2008) e fungos (SHANNER & FINNEY, 1977).

Dentre os elicitores de origem biótica, o polissacarídeo quitosana, derivado da desacetilação da quitina (CRAVEIRO et al., 2004), apresenta baixa toxicidade e tem sido relatado como indutor de resistência em culturas como a do tomateiro contra *R. solani* (MAZARO et al., 2009), feijoeiro-comum contra *C. lindemuthianum* (DI PIERO & GARDA, 2008) e amendoim contra *Puccinia arachidis* (SATHIYABAMA & BALASUBRAMANIAN, 1998). Outros potenciais usos para a quitosana são o recobrimento de sementes para proteção de plântulas contra fungos de solo (MAZARO et al., 2009), podendo auxiliar no vigor e na germinação (TANADA-PALMU et al., 2005) e o recobrimento de frutos *in natura* (SHANNER & FINNEY, 1977), ou minimamente processados, protegendo-os de infecções e da desidratação (ASSIS & LEONI, 2003;)

O acibenzolar-S-metílico (ASM) é o ingrediente ativo do único, até o presente momento, produto registrado no país como ativador de defesas de plantas (MAPA, 2011). O ASM é translocado sistemicamente pela planta, atuando como um sinalizador capaz de desencadear mecanismos de defesa (BENHAMOU & BÉLANGER, 1998), com destaque aos relacionados ao metabolismo dos fenilpropanóides, como a

produção de fitoalexinas da classe dos flavonóides (SIEGRIST et al., 1998). Atualmente, o produto pode ser comercializado para fins de prevenção de doenças fúngicas, bacterianas ou viróticas, em culturas como tomate (*Solanum lycopersicum*), batata (*S. tuberosum*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) (MAPA 2011).

Neste estudo, testou-se suspensão do polissacarídeo quitosana e a suspensão aquosa do ativador de defesas acibenzolar-S-metílico para o controle da cercosporiose da beterraba, e buscou-se identificar de que forma ambos os produtos poderiam estar agindo para reduzir a severidade da doença.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da pulverização de quitosana e acibenzolar-S-metílico no controle da cercosporiose da beterraba de mesa e na ativação de mecanismos de resistência bioquímicos da planta.

3.2.2. Objetivos específicos

- Testar a eficiência da pulverização preventiva de quitosana ou acibenzolar-S-metílico no controle da cercosporiose da beterraba;
- Avaliar alterações bioquímicas (atividades de enzimas peroxidases e β -1,3 glucanases, teores de flavonóides, compostos fenólicos totais e betalaínas) em folhas de beterraba, pulverizadas com quitosana ou acibenzolar-S-metílico;
- Verificar se quitosana ou acibenzolar-S-metílico afetam diretamente o crescimento micelial e a germinação de esporos de *C. beticola*.

3.3. HIPÓTESES

- Plantas de beterraba pulverizadas com quitosana ou acibenzolar-S-metílico apresentam menor severidade de cercosporiose após a inoculação com *Cercospora beticola*.

- O controle da doença é relacionado a mecanismos de defesa bioquímicos pós-formados e/ou ao efeito direto de algum dos produtos sobre o crescimento micelial e/ou a germinação de esporos do patógeno.

3.4. METODOLOGIA

3.4.1. Isolamento de *Cercospora beticola*

O isolado monospórico de *C. beticola* foi obtido a partir de folhas de beterraba com sintomas de cercosporiose coletadas em Florianópolis/SC, e está depositado na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da UFSC sob o código MANE 163.

As folhas de beterraba foram selecionadas, lavadas e colocadas em câmara úmida a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 48 horas, com o auxílio de um furador de metal com 6 mm de diâmetro, foram retiradas lesões das folhas que apresentavam esporulações, observadas sob estereoscópio. Cinquenta lesões foram fatiadas, colocadas em um tubo Falcon de 15 mL e agitadas em vórtex por 4 min. A porção líquida foi coletada e uma alíquota de 50 µL foi espalhada com alça de Drigalski em uma placa de Petri contendo meio de cultura água-água. Após a secagem, com auxílio de microscópio óptico, foram realizados isolamentos monospóricos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-água, conferindo-se em seguida, no microscópio, se havia sido transferido apenas um conídio para cada placa.

Para verificar a patogenicidade dos seis diferentes isolados obtidos, mudas de beterraba sadias foram inoculadas com 2×10^4 conídios.mL⁻¹ e mantidas em câmara úmida por 48 horas. Após o período de 10 dias, o isolado que se mostrou mais agressivo com base na severidade de doença causada nas folhas, foi selecionado para ser utilizado nos experimentos posteriores. O fungo foi mantido em meio de cultura V8-água durante todo o período de experimentos, sob fotoperíodo de 12 horas e 25 °C de temperatura, com repicagem a cada 10 dias. Nessas condições, *C. beticola* forma colônias inicialmente de coloração negra, que se tornam acinzentadas no centro, conforme se desenvolvem.

O fungo foi identificado como *Cercospora beticola* a partir de características morfológicas, observadas em microscópio óptico de 100 conídios e de hifas, e dos sintomas apresentados em plantas inoculadas, os quais foram comparados com o descrito na literatura (CARUEL, 1876; WEILAND & KOCH, 2004; AGRIOS, 2005). Os conídios são

hialinos, aciculados, medindo em média 238 μm de comprimento. O período de incubação foi em média de 9 dias, quando surgem sintomas característicos da cercosporiose, como lesões necróticas com halo avermelhado, inicialmente nas folhas mais velhas.

3.4.2. Esporulação *in vitro* de *Cercospora beticola*

Este experimento teve como objetivo avaliar a esporulação de *C. beticola* sobre diferentes meios de cultura. Os meios testados foram: batata-dextrose-água - BDA (39 g.L^{-1} de meio de cultura comercial Hi-media®); V8-água (200 mL de suco de vegetais V8 Campbell Soup Company®; 800 mL de água destilada; 15 g de água, 3,2 g de CaCO_3); extrato de levedura-água (1000 mL de água destilada; 2 g de extrato de levedura; 2,5 g de glucose; 15 g de água), ou extrato de folhas de beterraba-água, adaptado do meio 20 apresentado por Dhingra (1985) (300 g.L^{-1} de folhas de beterraba; 15 g.L^{-1} de água).

Os meios de cultura foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos, e vertidos em placas de Petri. Após a solidificação, um disco de 5 mm de diâmetro, oriundo de uma colônia de *C. beticola* de 10 dias, foi repicado para o centro de cada placa. As placas foram mantidas a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. O diâmetro das colônias foi avaliado aos 8, 10 e 18 dias após a repicagem. Em cada intervalo de tempo, avaliou-se também a quantidade de esporos através de hemacitômetro. O experimento foi conduzido sob delineamento completamente casualizado, com 4 repetições por tratamento.

3.4.3. Obtenção e preparo dos produtos

A quitosana (85% de desacetilação), foi preparada suspendendo-se o polissacarídeo em HCl 0,05 N com agitação constante e correção do pH para 5,6 com NaOH 2M.

As soluções de acibenzolar-S-metílico foram preparadas a partir do produto comercial Bion® 500 WG (Syngenta), o qual possui 50% do ingrediente ativo na sua composição. Esse foi dissolvido em água destilada, e as concentrações aqui apresentadas se referem ao ingrediente ativo.

3.4.4. Cultivo e tratamento das plantas, inoculação e avaliação da severidade da doença

Todos os experimentos em casa de vegetação foram realizados com plantas de beterraba oriundas de sementes comerciais da cultivar Maravilha (Isla®, Brasil). Essas foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células, em substrato comercial (Plantmax®), e ao possuírem cerca de 4 folhas, foram transplantadas para vasos (duas plantas por vaso) de 2 L contendo solo mineral argissolo vermelho-amarelo e composto orgânico, na proporção de 6:1.

As plantas foram tratadas quando possuíam cerca de seis folhas completamente expandidas. As pulverizações, tanto dos produtos quando do inóculo, foram efetuadas através de pulverizador manual de compressão prévia com capacidade para 1,25 L, até o ponto de gotejamento, aplicando-se cerca de 10 mL por planta.

Após a inoculação com 1×10^4 conídios.mL⁻¹, as plantas permaneceram no interior de sacos plásticos (50 cm x 70 cm) sob alta umidade relativa, pelo período de 36 horas.

Para avaliação da severidade da cercosporiose, as três folhas mais velhas em cada repetição foram escaneadas em multifuncional HP Deskjet F4450, com resolução de 300 dpi. Para quantificar a porcentagem de área foliar sintomática, as imagens foram submetidas ao programa Quant v.1.0.2. (VALE et al., 2001). O valor de severidade média das três folhas constituiu uma repetição. As folhas foram coletadas 20 dias após a inoculação.

3.4.5. Testes preliminares de proteção de plantas de beterraba

As plantas foram pulverizadas com água destilada, HCl 0,05 N, quitosana (2 ou 4 mg.mL⁻¹), ou acibenzolar-S-metílico - ASM (25 mg.L⁻¹) e, após 24 horas, foram inoculadas com *C. beticola*.

Em um segundo experimento, as plantas foram pulverizadas com HCl 0,05N, quitosana (2 mg.mL⁻¹) ou ASM a 25 mg.L⁻¹ e, 72 horas depois, inoculadas com *C. beticola*.

Ambos os experimentos foram conduzidos sob delineamento completamente ao acaso, com quatro repetições por tratamento.

3.4.6. Efeito de diferentes doses de quitosana e ASM para o controle da cercosporiose

Em dois experimentos distintos, verificou-se o efeito de doses de quitosana (0, 1, 2, 4 ou 8 mg.mL⁻¹) e doses de ASM (0, 12,5, 25, 50 ou 100 mg.L⁻¹) para o controle da cercosporiose. As plantas foram tratadas e, 72 horas depois, inoculadas com *C. beticola*. O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com seis repetições por tratamento.

3.4.7. Efeito do intervalo de tempo entre tratamento e inoculação sobre a cercosporiose

Neste experimento, as plantas de beterraba foram pulverizadas com quitosana (1 mg.mL⁻¹) ou ASM (50 mg.L⁻¹) aos 7, 5, 3 ou 1 dia antes da inoculação com *C. beticola*. O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com seis repetições por tratamento, e o momento da inoculação coincidiu para todos os tratamentos.

3.4.8. Avaliação dos mecanismos de ação bioquímicos da quitosana e do ASM no controle da cercosporiose da beterraba

A fim de avaliar os efeitos dos produtos sobre os mecanismos de defesa das plantas, foram conduzidos dois experimentos distintos. No primeiro, plantas de beterraba foram pulverizadas com quitosana (1 mg.mL⁻¹) aos 3 dias antes da inoculação ou com ASM (50 mg.L⁻¹) aos 7 dias antes da inoculação, de modo que o momento do desafio com o patógeno coincidissem para os diferentes tratamentos.

Foram realizadas coletas de amostras de folhas imediatamente antes da inoculação (tempo 0), 36 e 60 horas depois da inoculação. Para isso, foram amostrados 24 discos foliares de 8 mm de diâmetro por vaso, (folhas mais velhas, com exceção da folha primária), sendo 8 discos por folha, de três folhas diferentes por vaso (Figura 13). Os discos foram dispostos em papel alumínio de modo que cada amostra foi composta por seis discos, sendo dois de cada folha amostrada. Assim, de cada unidade experimental, foram obtidas amostras para a realização de quatro diferentes análises. As amostras foram submetidas a banho de gelo, e posteriormente conservadas a -20 °C, até o momento das análises bioquímicas.

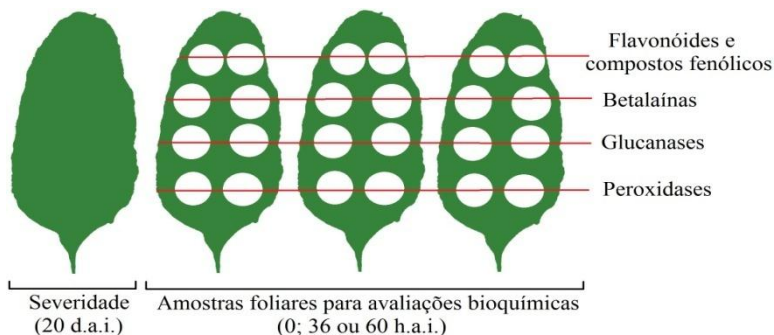


Figura 13. Esquema de amostragem para avaliação da severidade da cercosporiose e para a retirada de amostras foliares para as determinações de compostos químicos (experimento 1).

No segundo experimento, as plantas de beterraba foram pulverizadas com quitosana (1 mg.mL^{-1}) ou ASM (50 mg.L^{-1}) por duas vezes, a primeira aos 7 e a segunda aos 3 dias antes da inoculação do patógeno. Neste caso, foram coletados 18 discos foliares por vaso (seis discos por folha), os quais foram posteriormente dispostos em três diferentes subamostras de sei discos cada, de modo análogo ao experimento anterior, com dois discos de cada folha amostrada (Figura 14). A amostragem ocorreu imediatamente antes da inoculação (tempo 0), 72 e 120 horas depois da inoculação.

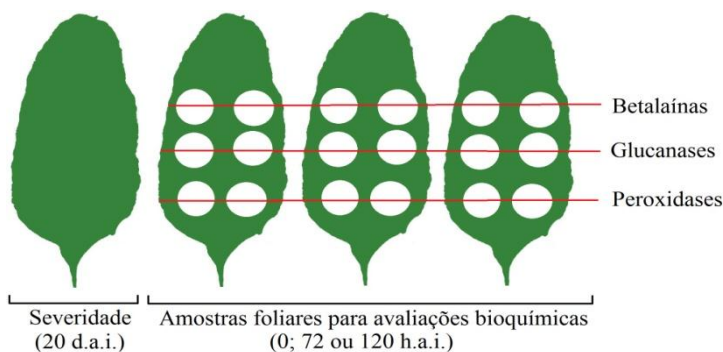


Figura 14. Esquema de amostragem para avaliação da severidade da cercosporiose e para a retirada de amostras foliares para as determinações de compostos químicos (experimento 2).

Nos dois experimentos, a porcentagem de área foliar sintomática de cercosporiose foi avaliada na folha remanescente. Assim, para cada tratamento, contou-se com 18 repetições para avaliação da severidade da doença.

3.4.8.1. Peroxidases, β -1,3-glucanases e proteínas totais

As atividades de enzimas peroxidases, β -1,3-glucanases e o teor de proteínas totais foram quantificados a partir da amostra composta por seis discos foliares (aproximadamente 200 mg) utilizando-se os mesmos volumes e concentrações de reagentes descritos no item 2.4.3.1. do capítulo 2.

3.4.8.2. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais, as amostras foliares foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em metanol 80 % acidificado com ácido clorídrico na proporção de 80:1 (v/v). A extração ocorreu por 1 hora, a temperatura ambiente, no escuro. Após esse período, o material foi filtrado sob vácuo em papel filtro Qualy® com poros de 14 μ m, e 0,5 mL do extrato foi acrescido de 0,5 mL de metanol 95 %, 1 mL de etanol 95 %, 3 mL de água e 0,5 mL do reagente Folin-Cicateau (Sigma®). Após 5 minutos de pré-incubação, acrescentou-se 1 mL de Na_2CO_3 a 5 % (m/v), e então se deixou incubando por mais 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, os valores de absorbância a 725 nm foram lidos em espectrofotômetro e anotados, e posteriormente plotados na curva-padrão de ácido gálico.

3.4.8.3. Determinação do conteúdo de flavonóides

A quantificação do teor de flavonóides totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Woisky & Salatino (1998). Para isso, 0,5 mL do extrato em metanol acidificado, obtido conforme o item 3.4.8.2., foram adicionados em 2,5 mL de etanol 99% e 0,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 2% (m/v). Após homogeneização em vórtex, o homogenato foi mantido no escuro por 1 hora. Os valores de absorbância a 420 nm foram lidos em espectrofotômetro, e os resultados interpolados em uma curva-padrão de quercetina.

3.4.8.4. Betalaínas

A quantificação das betalaínas foi realizada segundo o método descrito por Nilson (1973). O teor de betalaínas totais foi representado pela soma das quantidades estimadas de betaxantinas e betacianinas.

Para isso, as amostras foliares foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizado em água destilada, na proporção de 1:2 (m/v). O homogenato foi incubado por 24 horas, no escuro, em temperatura de 4 °C. Após este período, o material foi filtrado em filtro de papel Qualy® com poros de 14 µm, e disposto em frasco âmbar. Para cada amostra, foram realizadas leituras no espectrofotômetro em três diferentes comprimentos de onda (476 nm, 538 nm e 600 nm). A diluição dos extratos foi realizada em cubeta de quartzo, adicionando-se 150 µL de extrato em 850 µL de água, de modo que a densidade óptica no comprimento de 538 nm estivesse entre 0,2 e 0,5. Os cálculos foram feitos pelas seguintes fórmulas:

$$x = 1,095 (a - c)$$

$$y = (b - z - x) \cdot 3,1^{-1}$$

$$z = a - x$$

Onde, a= leitura da amostra (538 nm); b= leitura da amostra (476 nm); c= leitura da amostra (600 nm); x= absorção de betacianina; y= absorção de betaxantina e z= absorção de impurezas. Os resultados foram expressos em mg para cada 100 g de massa fresca de folhas (mg.100 g MF⁻¹)

3.4.9. Diâmetro de colônias de *Cercospora beticola* crescidas em presença de quitosana ou acibenzolar-S-metílico

Neste experimento, avaliou-se o crescimento micelial de *C. beticola* em meio de cultura V8-ágar contendo diferentes doses de quitosana (0; 1; 2; 4 ou 8 mg.mL⁻¹) ou de ASM (12,5; 25; 50 ou 100 mg.L⁻¹).

Para isso, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri e, após a solidificação, um disco contendo micélio do fungo foi repicado para o centro de cada placa, as quais foram posteriormente mantidas sob fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C. O diâmetro das colônias foi medido com auxílio de um paquímetro aos 10, 15 e 20 dias após a repicagem. O experimento foi conduzido sob delineamento completamente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

3.4.10. Germinação de esporos de *Cercospora beticola*

Colônias de 10 dias foram raspadas com o auxílio de alça de Drigalsky após a adição de 5 mL de água destilada estéril, e a concentração de esporos ajustada para 1×10^4 com o auxílio de um hemacitômetro. Em lâminas escavadas, 20 μL dos tratamentos foram adicionados a 20 μL da suspensão de esporos. As diluições foram preparadas de modo que a concentração final de quitosana fosse 0, 125, 250, 500 ou 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, e ASM 0, 25, 50, 100 ou 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. As lâminas foram dispostas no interior de placas de Petri, sob alta umidade relativa, e incubadas a 25 °C, sob luz constante. Após 8 horas, foi avaliada a germinação de no mínimo 100 esporos, considerando-se como germinados aqueles que apresentavam a emissão do tubo germinativo. O comprimento do tubo germinativo foi medido a partir de 30 conídios em microscópio óptico, com auxílio de ocular graduada.

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Crescimento micelial e esporulação *in vitro* de *Cercospora beticola*

Houve diferenças no crescimento micelial de *C. beticola*, dependendo do meio de cultura empregado (Figura 15A). No meio de cultura V8-água, o crescimento do fungo se ajustou ao modelo quadrático na equação de regressão linear, enquanto que nos demais meios de cultura, o patógeno cresceu linearmente até os 18 dias após a repicagem. O menor crescimento micelial foi observado no meio de cultura à base de extrato de folhas de beterraba (EF), enquanto que nos demais meios o crescimento fúngico foi similar ao longo do tempo.

A esporulação de *C. beticola* por unidade de área (cm^2) foi maior no meio de cultura V8-água aos 8 e 10 dias após a repicagem (Figura 15B). Esporulação também foi observada no meio de cultura BDA, nos mesmos tempos, porém em menor quantidade. O fungo não apresentou esporulação nos demais meios de cultura (EL e EF). Aos 18 dias após a repicagem, as colônias de *C. beticola* não apresentaram esporulação em nenhum dos meios de cultura testados.

A partir desses resultados, passou-se a utilizar o meio de cultura V8-água para a produção de esporos que foram utilizados nos experimentos *in vivo* em casa de vegetação, e nos testes de germinação de esporos *in vitro*.

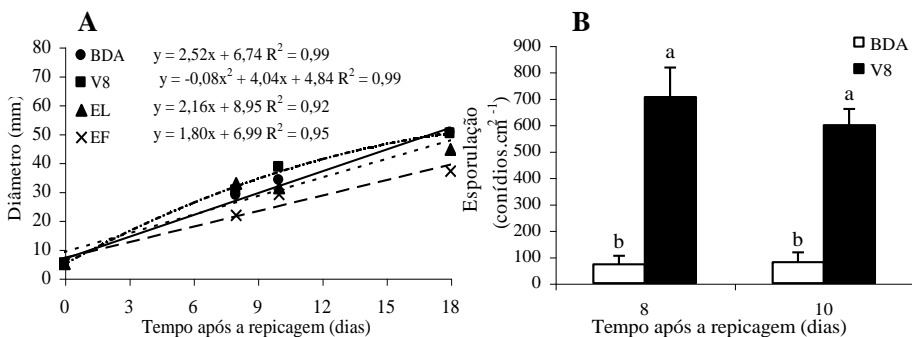


Figura 15. Crescimento micelial (A) e esporulação (B) de *Cercospora beticola* em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA,●), V8-ágar (V8,■), extrato de levedura (EL,▲) ou extrato de folha-ágar (EF,x). Houve diferença no diâmetro das colônias crescidas nos diferentes meios de cultura. Barras seguidas da mesma letra em B não diferem entre si pelo teste de SNK a 1% de probabilidade.

3.5.2. Testes preliminares de proteção de plantas de beterraba

No primeiro experimento conduzido com plantas em casa de vegetação, demonstrou-se que o polissacarídeo quitosana nas doses de 2 mg.mL⁻¹ e 4 mg.mL⁻¹, assim como o indutor de resistência ASM a 25 mg.L⁻¹, reduziram a severidade da cercosporiose em 72%, 72% e 55%, respectivamente, quando aplicados 24 h antes da inoculação. A severidade da doença nas plantas pulverizadas com HCl (pH 5,6) não diferiu do controle com água destilada (Figura 16).

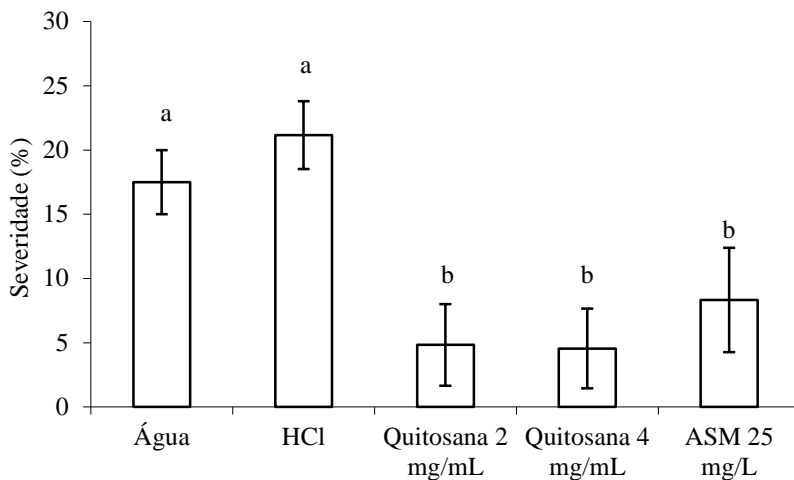


Figura 16. Severidade da cercosporiose em folhas de beterrabas pulverizadas com água, ácido clorídrico (HCl), quitosana ou acibenzolar-S-metílico (ASM) e, 24 horas depois, inoculadas com *Cercospora beticola*. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de SNK a 5 % de probabilidade.

Quando as plantas de beterraba foram pulverizadas com quitosana ou ASM 3 dias antes da inoculação, houve redução de aproximadamente 80% e 91% na severidade da cercosporiose em relação à testemunha, respectivamente (Figura 17).

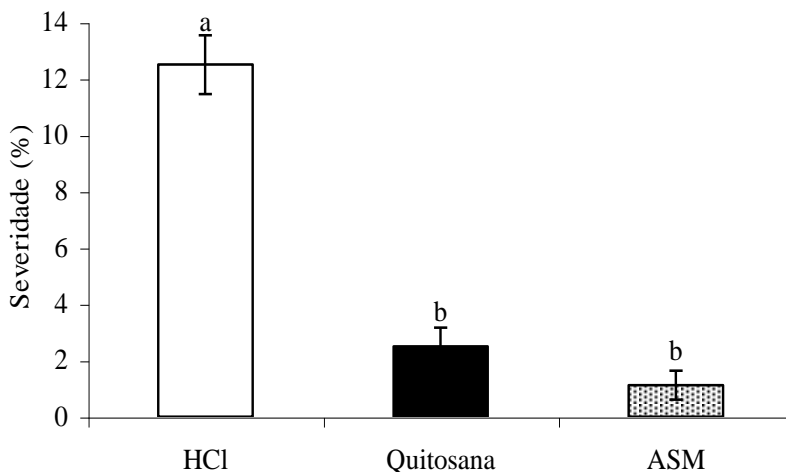


Figura 17. Severidade da cercosporiose em folhas de beterraba tratadas com ácido clorídrico 0,05N (HCl); quitosana (2 mg.mL^{-1}) ou acibenzolar-S-metílico a 25 mg.L^{-1} (ASM) e, 3 dias depois, inoculadas com *Cercospora beticola*. Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de SNK a 5 % de probabilidade.

3.5.3. Efeito de diferentes doses de quitosana e ASM para o controle da cercosporiose

Na Figura 18, pode-se observar que quitosana a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ reduziu a severidade da cercosporiose em 33%. A partir da concentração de 1 mg.mL^{-1} de quitosana, a qual resultou em redução de 62% da severidade da doença, não houve incremento do nível de controle da cercosporiose com o aumento da dose do polissacarídeo até 8 mg.mL^{-1} .

No caso do ASM, a dose de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentou nível de controle de 39%, havendo incremento no efeito do produto bastante acentuado aumentando-se a dose até $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$, a qual controlou em cerca de 72%. O maior efeito ocorreu quando as plantas foram pulverizadas com 50 mg.L^{-1} , onde a severidade da doença foi 90% menor que a da testemunha. O aumento da dose de 50 para 125 mg.L^{-1} não incrementou o nível de controle da doença (Figura 19).

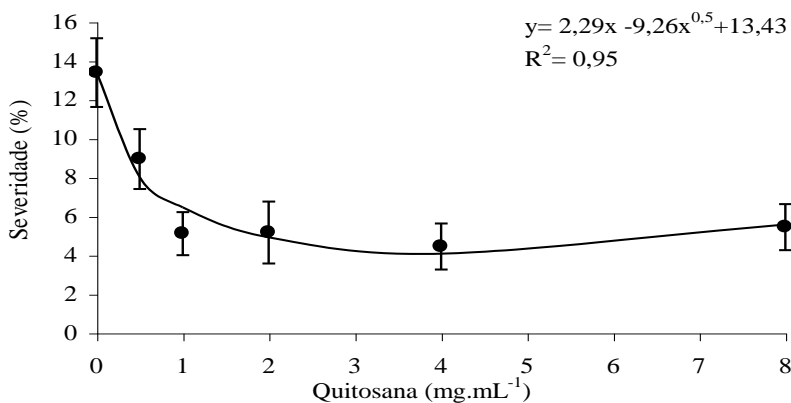


Figura 18. Severidade da cercosporiose em folhas de beterraba tratadas com diferentes doses de quitosana e, 3 dias depois, inoculadas com *Cercospora beticola*. Houve efeito de doses de quitosana pelo teste de F a 1% de probabilidade.

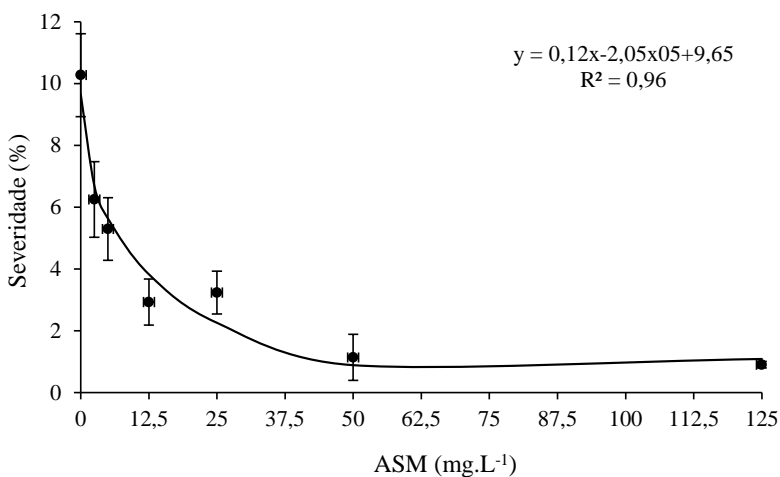


Figura 19. Severidade da cercosporiose em folhas de beterrabas tratadas com diferentes doses de acibenzolar-S-metílico (ASM) e, 3 dias depois, inoculadas com *Cercospora beticola*. Houve efeito de doses de ASM pelo teste de F a 1% de probabilidade.

3.5.4. Efeito do intervalo de tempo entre tratamento e inoculação sobre a cercosporiose

Posteriormente, quitosana a 1 mg.mL^{-1} e ASM a 50 mg.L^{-1} foram aplicados nas plantas de beterraba em diferentes intervalos de tempo antes da inoculação do patógeno (1, 3, 5 ou 7 d.a.i.). Os resultados estão demonstrados na Tabela 2.

Em todos os intervalos de tempo testados, as plantas tratadas com quitosana e ASM apresentaram menores severidades de doença em comparação com a testemunha. Porém, houve interação entre tratamentos e tempo antes da inoculação. No caso da quitosana, as menores severidades de doença foram observadas quando essa foi pulverizada 1 d.a.i. ou 3 d.a.i., e no caso do ASM, as menores severidades foram observadas quando o produto foi aplicado aos 5 d.a.i. ou aos 7 d.a.i..

Tabela 2. Severidade (%) da cercosporiose em folhas de beterraba pulverizadas com água, quitosana (1 mg.mL^{-1}) ou acibenzolar-S-metílico (ASM 50 mg.L^{-1}), em diferentes intervalos de tempo antes da inoculação com *Cercospora beticola*.

Tratamento	Dias antes da inoculação			
	1	3	5	7
Água	11,4 a A	10,6 a A	10,8 a A	12,1 a A
Quitosana	3,8 b B	4,2 b B	7,5 a B	6,5 a B
ASM	3,8 a B	3,9 a B	2,5 ab C	1,3 b C

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de SNK a 5 % de probabilidade. Houve interação entre os diferentes produtos aplicados com o tempo de aplicação antes da inoculação, pelo teste de F a 1 % de probabilidade.

3.5.5. Avaliação dos mecanismos de ação bioquímicos da quitosana e do ASM no controle da cercosporiose da beterraba

Quitosana e ASM foram pulverizados sobre as folhas de beterraba nas doses e no intervalo de tempo antes da inoculação mais eficazes no controle da doença. Ou seja, no caso do polissacarídeo, foi utilizada a dose de 1 mg.mL^{-1} aplicada 3 dias antes da inoculação (d.a.i.) e, para o ativador de defesas ASM, utilizou-se a concentração de 50 mg.L^{-1} do produto aplicada 7 d.a.i..

A aplicação de quitosana (1 mg.mL^{-1} ; 3 d.a.i.) e de ASM (50 mg.L^{-1} ; 7 d.a.i.) reduziu a severidade da cercosporiose, em níveis médios de 48,5% e 82,1%, respectivamente (Figura 20A). A aplicação dos produtos não interferiu no teor de betalaínas nas folhas (Figura 20B).

Em relação à atividade de peroxidases, no momento da inoculação, as plantas pulverizadas com quitosana e ASM apresentaram atividades enzimáticas significativamente maiores quando comparadas à testemunha. Nas plantas pulverizadas com água destilada, a atividade aumentou continuamente após a inoculação, enquanto que naquelas onde foram aplicados quitosana ou ASM, ocorreu aumento da atividade enzimática 60 horas depois da inoculação do patógeno (Figura 20C).

As plantas que receberam a aplicação de ASM apresentaram maior atividade de enzimas β -1,3 glucanases durante as 60 horas após a inoculação, em relação àquelas que foram pulverizadas com água destilada ou quitosana. A 36 h após a inoculação, houve um pico na atividade de glucanases nas plantas tratadas com ASM, tempo no qual houve diferença estatisticamente significativa em relação aos demais tratamentos (Figura 20D).

Não houve diferença significativa nos teores de flavonóides (Figura 20E) e compostos fenólicos totais (Figura 20F) de plantas pulverizadas com quitosana ou ASM até 60 horas após a inoculação.

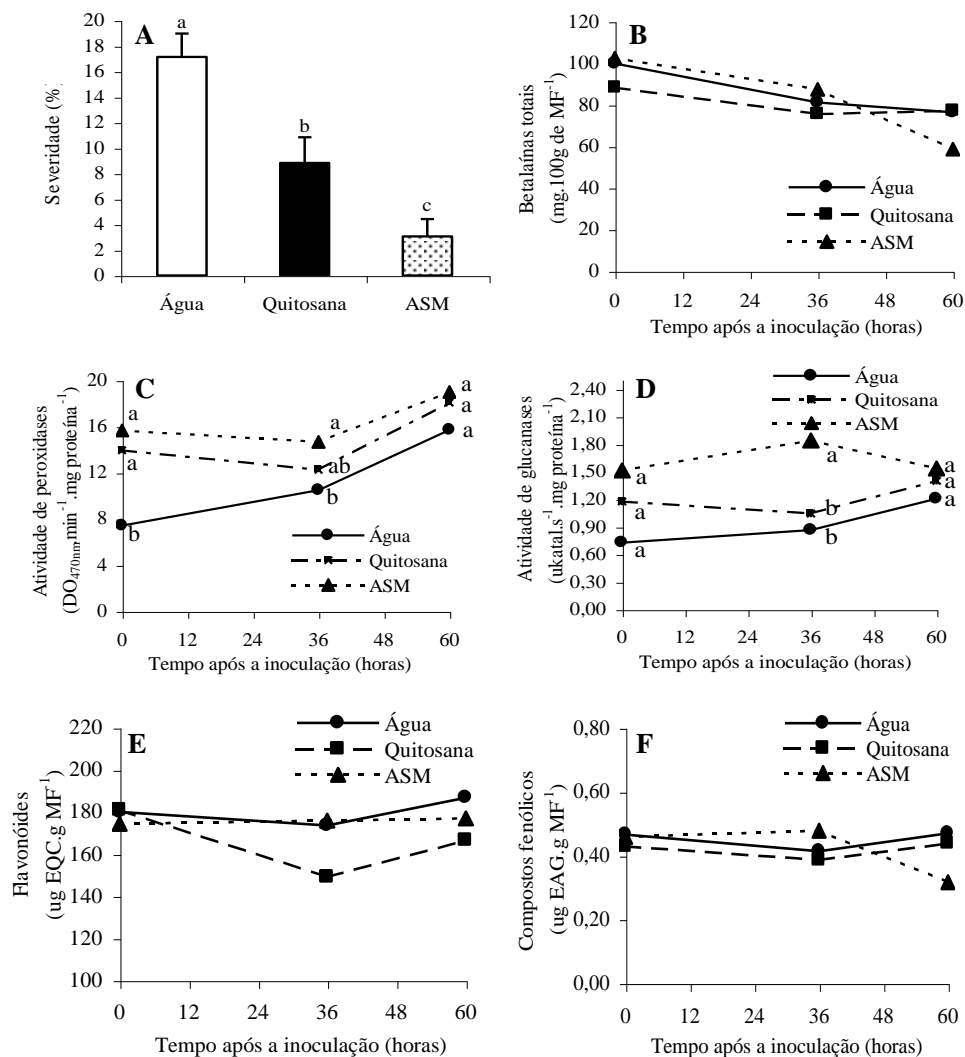


Figura 20. Severidade da cercosporiose (A), teor de betalainas (B), atividades de enzimas peroxidases (C) e β -1,3 glucanases (D), e teores de flavonóides (E) e compostos fenólicos totais (F), em folhas de beterraba pulverizadas com quitosana (1 mg.mL⁻¹) 3 d.a.i. ou ASM (50 mg.L⁻¹) 7 d.a.i. de *Cercospora beticola*. Barras seguidas pela mesma letra em A, e marcadores seguidos pela mesma letra em C e D dentro de

cada tempo, não diferem entre si pelo teste de SNK a 5% de probabilidade.

No último experimento, quitosana a 1 mg.mL^{-1} ou ASM a 50 mg.L^{-1} , foram aplicadas por duas vezes nas plantas, uma pulverização aos 3 d.a.i. e outra aos 7 d.a.i. de *C. beticola*. Como é possível observar na Figura 21A, novamente, quitosana e ASM reduziram a severidade da cercosporiose nas folhas de beterraba, em níveis médios de 49,7% e 85,6%, respectivamente.

Após 120 horas da inoculação, as plantas que receberam a aplicação de água destilada apresentaram maior teor médio de betalainas totais, em comparação com aquelas que foram pulverizadas duas vezes com quitosana ou ASM, porém não foi estatisticamente diferente (Figura 21B).

No momento da inoculação, as plantas que receberam as aplicações de quitosana apresentaram maior atividade de enzimas peroxidases do que aquelas nas quais foi aplicado ASM ou água, e essa atividade se manteve praticamente constante até as 120 horas após a inoculação. Nas plantas que receberam ASM, houve um grande incremento na atividade enzimática 72 horas após a inoculação do patógeno. Nessas plantas, a atividade de peroxidases se igualou à das plantas tratadas com quitosana, no tempo 120 horas depois da inoculação (Figura 21C).

A atividade de enzimas β -1,3 glucanases foi maior nas plantas que receberam quitosana ou ASM em relação à testemunha em todos os tempos amostrados. Após a inoculação do patógeno, a atividade enzimática se elevou nas plantas que receberam a aplicação de ASM (Figura 21D).

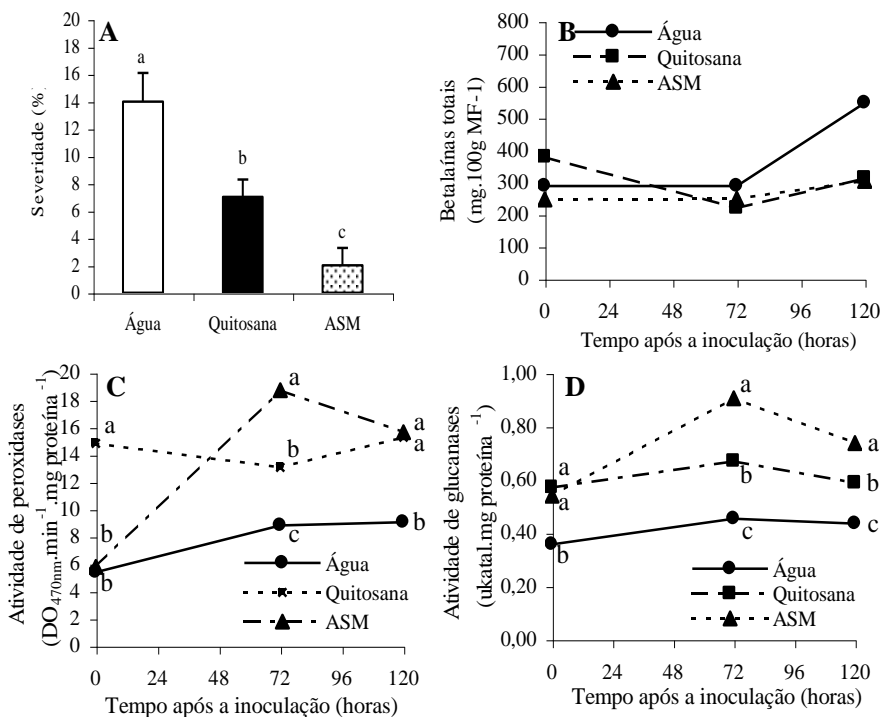


Figura 21. Severidade de cercosporiose (A), teor de betalainas totais (B), atividades de enzimas peroxidases (C) e β -1,3 glucanases (D), em folhas de beterraba pulverizadas com quitosana (1 mg.mL^{-1}) ou ASM (50 mg.L^{-1}) aos 3 d.a.i. e aos 7 d.a.i. de *Cercospora beticola*. Barras seguidas pela mesma letra em A, e marcadores seguidos pela mesma letra em C e D dentro de cada tempo, não diferem entre si pelo teste de SNK a 5% de probabilidade.

3.5.6. Diâmetro de colônias e germinação de esporos de *Cercospora beticola* na presença de quitosana ou acibenzolar-S-metílico

Quitosana acrescentada ao meio BDA na dose de 1 mg.mL^{-1} inibiu fortemente o crescimento da colônia de *C. beticola* (diâmetro 76,5% menor em relação à testemunha), não havendo incremento significativo do seu efeito antimicrobiano até a concentração de 8 mg.mL^{-1} (Figura 22A). No caso do ASM, houve redução no crescimento

micelial a partir da dose de 12,5 mg.L⁻¹, porém o maior efeito ocorreu a partir da dose de 50 mg.L⁻¹, na qual o diâmetro médio das colônias foi 29,4% menor que o da testemunha (Figura 22B).

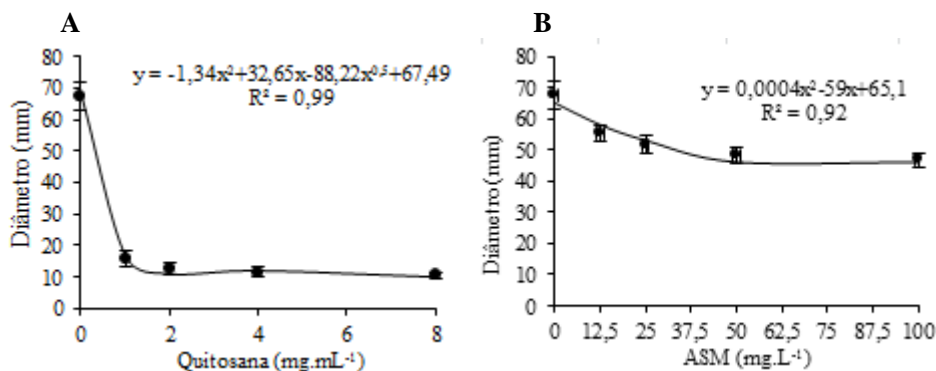


Figura 22. Diâmetro de colônias de *Cercospora beticola* em meio de cultura BDA 20 dias depois da repicagem, crescidas na presença de diferentes concentrações de quitosana (A) ou acibenzolar-S-metílico – ASM (B). Houve efeito de doses tanto para quitosana quanto para ASM, pelo teste de F a 1% de probabilidade.

Os efeitos das diferentes concentrações de quitosana e ASM estão ilustrados na Figura 23.

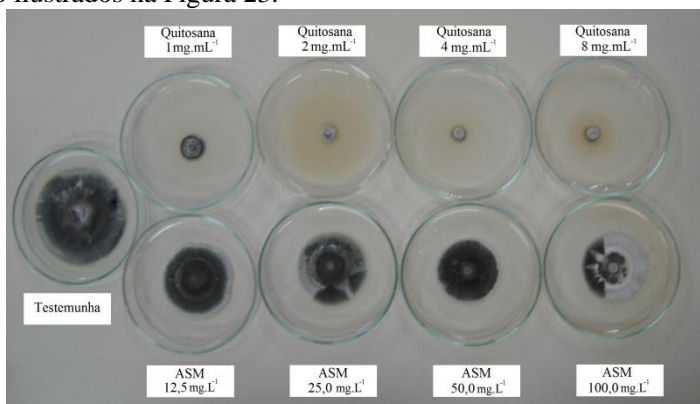


Figura 23. Colônias de *Cercospora beticola* em meio de cultura BDA, na presença de diferentes concentrações de quitosana ou acibenzolar-S-metílico (ASM), aos 20 dias após a repicagem.

Ao considerar-se o crescimento micelial de *C. beticola* nos meios de cultura com diferentes concentrações de quitosana ou ASM, no decorrer do tempo, verificou-se que o polissacarídeo afetou o diâmetro das colônias mais intensamente do que o ativador de defesas, porém esse último também apresentou efeito direto contra o crescimento micelial do patógeno (Figura 24).

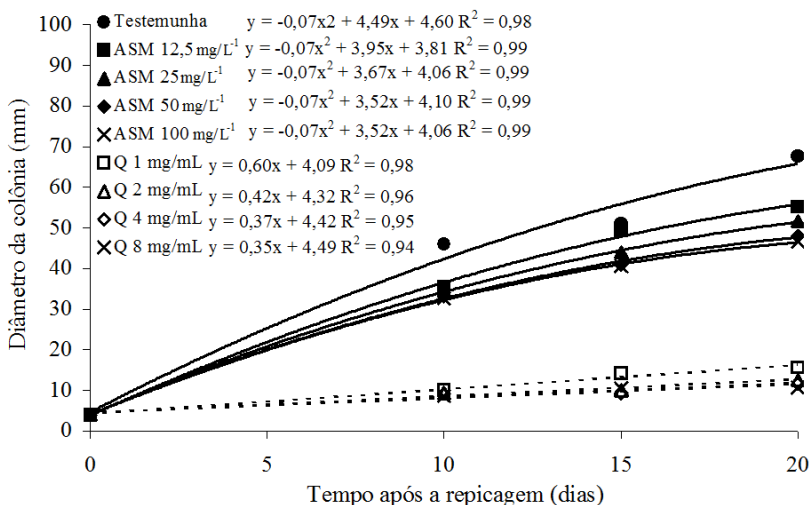


Figura 24. Diâmetro de colônias de *Cercospora beticola* em meio de cultura BDA, na presença de diferentes concentrações de quitosana ou ASM. Houve diferença entre os tratamentos pelo teste de F a 1 % de probabilidade.

O resultado do teste de germinação de esporos demonstrou que essa foi menor nos tratamentos onde havia a presença de quitosana. Na dose de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a germinação foi em média 34% menor do que na testemunha. Em relação ao comprimento do tubo germinativo, esse também foi menor à medida que a dose foi aumentada, a partir de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que na maior concentração (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi 43,4% menor do que na testemunha (Figura 25).

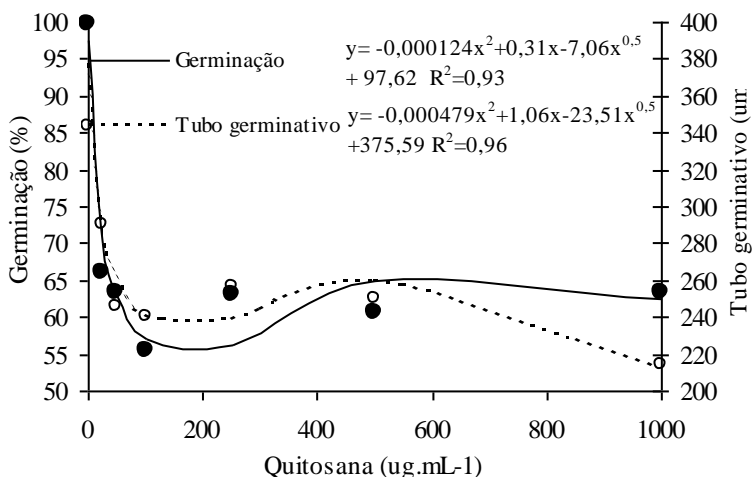


Figura 25. Germinação de conídios e comprimento do tubo germinativo de *Cercospora beticola* após 8 horas na presença de diferentes concentrações de quitosana. Houve efeito de doses para as duas características avaliadas pelo teste de F a 1% de probabilidade.

A porcentagem de germinação e o comprimento do tubo germinativo de *C. beticola*, não foram diminuídos na presença de ASM até a dose de 200 mg.L^{-1} (Tabela 3).

Tabela 3. Germinação de conídios e comprimento do tubo germinativo de *Cercospora beticola* após 8 horas na presença de diferentes concentrações de ASM.

Dose (mg.L^{-1})	Germinação (%)	Comprimento do tubo germinativo (μm)
0	99 ± 2 n.s.	311 ± 10 n.s.
25	98 ± 1	305 ± 15
50	98 ± 1	302 ± 19
100	99 ± 1	291 ± 18
200	98 ± 1	306 ± 24
Média	99	303

¹Valor da média \pm desvio padrão.

Não houve efeito de doses de ASM sobre a germinação de esporos e sobre o comprimento do tubo germinativo de *C. beticola* pelo teste F a 1% de probabilidade.

3.6. DISCUSSÃO

O fungo *C. beticola* apresentou baixa capacidade de esporulação no meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) no qual foi inicialmente mantido logo após o isolamento. Dessa forma, a fim de viabilizar a produção de inóculo, foi necessária a condução de ensaio que buscasse maiores taxas de produção de conídios a serem utilizados nos experimentos em casa de vegetação e *in vitro*. Quando crescido em meio de cultura V8-ágar, a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, o fungo apresentou maior produção de esporos por unidade de área (cm²) em comparação com os demais meios de cultura testados, aos 8 e 10 dias após a repicagem. Meios complexos ou naturais, constituídos de partes ou de infusões de tecidos vegetais como folhas, sementes, raízes e frutos podem estimular fungos a esporularem, a exemplo do obtido para os fungos *Pyrenophora semeniperda* (agente causal de manchas foliares em cereais de inverno) e *Valdensinia heterodoxa* (biocontrolador de plantas invasoras), crescidos em meios à base de aveia, aveia e água de coco, respectivamente (CAMPBELL et al., 1996; ZHAO et al., 2006). No entanto, *C. beticola* não produziu esporos no meio natural envolvendo folhas de beterraba.

Outros fungos do gênero *Cercospora* também apresentam maior esporulação em meio de cultura à base de suco V8, como demonstrado por Brunelli (2004), onde a formação de esporos de *C. zeae-maydis* tanto sob fotoperíodo quanto sob luz constante foi superior em relação aos meios à base de aveia, suco de tomate, folhas de milho e BDA. Para *C. piaropi*, um fungo utilizado como biocontrolador de populações de aguapé (*Eichhornia crassipes*), o meio de cultura à base de suco V8 proporcionou maiores massa micelial e esporulação em comparação com meio à base de batata e dextrose (ÁVILA & PITELI, 2004).

No presente estudo, o crescimento micelial de *C. beticola* em V8-ágar não foi diferente em relação a BDA e EL. O meio de cultura à base de extrato de folhas de beterraba (EF) resultou no menor crescimento micelial. Outros autores indicam que o meio de cultura V8 apresenta maior riqueza nutricional e quantidade de carboidratos complexos, o que pode induzir à reprodução de alguns fungos mitospóricos (MOORE-LANDECKER, 1972 apud BRUNELLI, 2004). A partir desses resultados, passou-se a utilizar o meio de cultura V8-ágar para a produção de inóculo.

Nos testes preliminares em casa de vegetação, constatou-se que tanto o policassacarídeo quitosana quanto o ativador de defesas ASM

foram capazes de reduzir a severidade da cercosporiose em beterraba quando aplicados preventivamente. Observou-se que não houve diferença entre aplicar a dose de 2 mg.mL^{-1} ou 4 mg.mL^{-1} de quitosana, indicando que o efeito do produto não foi proporcional à dose utilizada. Nesses testes iniciais também foi verificado que não houve diferença entre pulverizar as plantas com água destilada ou HCl 0,05N com pH corrigido para 5,6 quanto à severidade da doença.

Posteriormente, ambos quitosana e ASM confirmaram a capacidade de reduzir a severidade da cercosporiose quando aplicados preventivamente, porém os tempos entre tratamento e inoculação que resultaram em maior controle foram distintos para os dois tratamentos. Para quitosana, o maior efeito ocorreu quando o polissacarídeo foi aplicado 3 ou 1 dia antes de inocular o patógeno, enquanto que para o ASM, o maior efeito se deu quando esse foi pulverizado sobre as plantas 5 ou 7 dias antes do desafio com o fungo.

Para ambos os produtos testados, principalmente no caso da quitosana, observou-se que a partir de determinada concentração não houve incremento do seu efeito na redução da severidade da doença. A dose ótima de quitosana para o controle da cercosporiose foi de 1 mg.mL^{-1} , não se tornando interessante então aplicá-la em concentrações superiores, tanto pelo maior gasto do produto quanto pela maior dificuldade de aplicação devido ao aumento da viscosidade da suspensão. Com a dose de 1 mg.mL^{-1} , houve redução da severidade em até 62%. Resultados similares foram observados quando a quitosana foi testada sobre o crescimento micelial, germinação de esporos e comprimento do tubo germinativo de *C. beticola*. O diâmetro das colônias foi reduzido em 76% quando na presença de quitosana a 1 mg.mL^{-1} , a dose ótima para o controle da doença. No caso da germinação de esporos e no comprimento do tubo germinativo, houve a mesma tendência do efeito do produto, se estabilizar com o aumento da dose, sendo a concentração ótima a de $25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A atividade da quitosana ocorre possivelmente através das interações de cargas positivas na sua cadeia com cargas negativas de resíduos de macromoléculas, expostas na superfície das células fúngicas, que resultam em alterações na permeabilidade da membrana (BENHAMOU, 1992). Visto que a disponibilidade de cargas na superfície das células do patógeno é limitada à sua área superficial, a estabilização do efeito da quitosana com o aumento da dose pode ser devido à saturação das cargas disponíveis na superfície do microrganismo. Nos resultados dos experimentos em casa de vegetação,

também houve a tendência do efeito do produto se estabilizar à medida que a sua concentração foi aumentada.

A interação da quitosana com fungos pode resultar em alterações morfológicas no tubo germinativo, como acontece com *P. expansum*, *B. cinerea* e *P. aphanidermatum* (EL GHAOUTH et al., 1994; LIU et al., 2007). Outros possíveis modos de ação da quitosana são o de atuar como quelante, indisponibilizando metais necessários a alguns fungos na produção de toxinas (CUERO et al., 1991), ou através de alterações nos processos de transcrição de mRNA e síntese protéica (SUDHARSHAN et al., 1992).

Além de reduzir a severidade da cercosporiose por atuar diretamente sobre o fitopatógeno, a quitosana poderia estar ativando mecanismos de defesa na beterraba. A literatura é farta em trabalhos mostrando o efeito indutor de resistência do polissacarídeo, como o demonstrado por Vander et al. (1998), por Capdeville et al. (2002) em frutos de maçã, Khan et al. (2003) em folhas de soja e Lin et al. (2005) em plantas de arroz.

Steiner & Schönbeck (1995) indicam que entre as características da resistência induzida estão a ausência de efeito tóxico do agente indutor sobre o patógeno, a necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência e a falta da relação entre a magnitude da resistência expressa e quantidades do indutor aplicado. A quitosana não atendeu a todas as características de um indutor de resistência citadas por Steiner & Schönbeck (1995), por outro lado, o polissacarídeo desencadeou mecanismos de resistência nas folhas de beterraba.

Aplicando-se os produtos nas doses e intervalos entre tratamento e inoculação mais eficazes, observou-se que tanto a quitosana quanto o ASM confirmaram a eficácia em reduzir a severidade da doença, porém o indutor de resistência comercial foi mais eficiente.

As plantas que receberam quitosana, de modo geral, apresentaram incremento na sua atividade enzimática de peroxidases, em comparação com a testemunha, tanto quando o produto foi aplicado uma ou duas vezes antes da inoculação. A maior atividade dessas proteínas-RP foi causada apenas pelo efeito do polissacarídeo, visto que no primeiro tempo amostral ainda não havia o desafio com o patógeno.

As plantas tratadas com quitosana também apresentam elevação na atividade de β -1,3 glucanases. A atividade da enzima também foi elevada pelo produto antes do desafio com o patógeno. A capacidade da

quitosana em induzir a síntese de enzimas β -1,3 glucanases foi demonstrada por Di Piero & Garda (2008), onde plantas de feijoeiro-comum que receberam a aplicação de 9 mg de quitosana, aos quatro dias antes da inoculação com *C. lindemuthianum*, apresentaram severidade de antractonse cerca de 70% menor que a testemunha. Sathiyabama & Balasubramanian (1998), após aplicarem quitosana em plantas de amendoim (*Arachis hypogaea*), verificaram maior atividade de β -1,3 glucanases dos 4 aos 14 dias após a pulverização, e associaram o menor número de lesões de ferrugem (*Puccinia arachidis*) com o incremento da atividade de proteínas-RP.

Portanto, os resultados demonstraram que a quitosana pode ter atuado no controle da cercosporiose tanto através da sua atividade antimicrobiana quanto pela elicitação de mecanismos bioquímicos de defesa. O duplo modo de ação também ficou evidenciado no controle do mofo-cinza (*Botrytis cinerea*) em pepino (*Cucumis sativus*) onde o polissacarídeo reduziu a germinação de esporos e o crescimento do tubo germinativo do fungo *in vitro*, assim como elicitou a síntese de enzimas peroxidases nas folhas (BEN SHALON et al., 2002).

Para o ASM, houve a tendência do efeito protetor do produto de se manter constante a partir da dose de 50 mg.L⁻¹. Porém, essa mesma concentração não afetou a germinação de esporos, nem o comprimento do tubo germinativo de *C. beticola*. Há indícios de que o efeito direto do ASM sobre fitopatógenos é variável em função da espécie, e do estágio de desenvolvimento. O estudo desenvolvido por Nojosa et al. (2009) demonstrou que a germinação de conídios de *Phoma costarricensis*, agente causal da mancha de *Phoma* em cafeeiro, não foi reduzida até a dose de 50 mg.L⁻¹, porém em meio de cultura com a mesma concentração do produto, o crescimento micelial do patógeno foi 17% menor que a testemunha. Bengtsson et al. (2006) demonstraram que a dose de 400 mg.L⁻¹ de ASM teve baixo efeito sobre a germinação de esporos de *V. inaequalis*, e estimulou o crescimento do tubo germinativo do fungo, evidenciado 48 horas após a germinação. Ribeiro et al. (2006) demonstraram que a germinação de conídios de *Verticillium-dahliae* foi reduzida em 33% quando na presença de ASM a 200 mg.L⁻¹. No caso de *C. beticola*, o ASM apresentou pequeno efeito apenas sobre o crescimento micelial do fungo.

O ASM é o primeiro, e até o momento, único produto registrado como ativador de plantas no Brasil (MAPA, 2011). O produto apresenta sistemicidade na planta, atuando como um mensageiro secundário,

culminando na expressão de genes e formação de enzimas relacionadas a processos de defesa (BENHAMOU & BÉLANGER, 1998).

Quando o ASM foi aplicado apenas uma vez antes da inoculação, a atividade de peroxidases foi superior à das plantas-testemunha antes do desafio com o fungo, indicando que o produto induz respostas bioquímicas sem a necessidade de interação com o patógeno. De modo geral, a atividade de peroxidases e de β -1,3 glucanases foi superior nas plantas tratadas com o indutor de defesa em comparação com os demais tratamentos. Em macieira, Brisset et al. (2000) observaram que plantas de macieira que receberam a aplicação de ASM (200 mg.L^{-1}) apresentaram menor severidade do fogo bacteriano (*Erwinia carotovora*) e maiores teores de enzimas β -1,3 glucanases. Bengtsson et al. (2009) utilizando ASM (200 mg.L^{-1}) obtiveram controle da sarna da macieira (*Venturia inaequalis*) e, acompanhando o processo infeccional, observaram que o patógeno apresentou maior dificuldade de penetração e desenvolvimento.

A elevação da concentração de enzimas antioxidantes é relacionada, de modo geral, à maior tolerância a estresses ambientais, e no caso da interação com fitopatógenos, enzimas peroxidases podem interagir com peróxido de hidrogênio na oxidação de compostos fenólicos que culminam na produção de moléculas relacionadas à defesa da planta, a exemplo de fitoalexinas e de polifenóis como a lignina (HARKIM & OBST, 1973; GULEN & ERES, 2003). *C. beticola* durante o processo de infecção utiliza uma toxina chamada cercosporina, a qual pode reagir com oxigênio molecular e formar espécies reativas de oxigênio capazes de destruir as membranas celulares da planta, enquanto que o fungo se protege dessas moléculas altamente reativas produzindo piridoxina, a qual atua como antioxidante (DAUB & EHRENSHAFT, 2000; AGRIOS, 2005). Deste modo, uma investigação mais detalhada do papel de enzimas peroxidases na preservação da integridade das membranas plasmáticas da planta poderia elucidar se elas podem estar protegendo o hospedeiro contra o armamento químico do patógeno. Outra forma que as enzimas peroxidases estariam contribuindo no controle da doença é através do fortalecimento das paredes celulares (VAN LON et al., 2006). A maior atividade dessas enzimas já foi relacionada ao controle de outras doenças de plantas, como em feijoeiro onde plantas tratadas com ASM (75 mg.L^{-1}) apresentaram menor severidade de mancha-angular provocada por *Pseudocercospora griseola* (VIECELLI et al., 2009).

As enzimas β -1,3 glucanases são endoglucanases capazes de hidrolizar β -1,3 glucanas, um importante componente da parede celular de muitos fungos, existindo em suas isoformas ácidas e básicas (CAVALCANTI et al., 2005). Enquanto as básicas situam-se dentro do vacúolo, as formas ácidas encontram-se nas paredes celulares atuando diretamente na proteção da planta durante o processo infeccioso (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Em virtude do pH de extração e condução da reação de degradação da laminarina utilizado no presente estudo ser 5,0, infere-se que as principais isoformas aqui quantificadas estavam situadas nas paredes celulares. O fungo *Cercospora beticola*, apesar de não penetrar diretamente no tecido do hospedeiro durante o processo de colonização ocupa os espaços intercelulares (PAL & MUKHOPADHYAY, 1984), onde uma maior concentração da enzima de defesa pode ter resultado em menor severidade de doença nas plantas elicitadas pelos produtos. A relação entre o aumento da atividade enzimática de β -1,3 glucanases com a redução de doenças em plantas é reportada na literatura.

A redução da severidade da cercosporiose através da aplicação de quitosana ou ASM não demonstrou estar associada ao incremento nos teores de flavonóides, compostos fenólicos totais e betalainas totais, nos experimentos em que esses parâmetros foram avaliados.

Os resultados aqui expostos indicam que ambos os produtos podem ser utilizados com o objetivo de controlar a cercosporiose em beterraba mediante a aplicação preventiva. No caso da quitosana, devido aos menores tempos entre tratamento e inoculação serem mais eficazes e ao seu efeito sobre a germinação de esporos e sobre o crescimento micelial *in vitro* de *C. beticola*, junto com a elevação da atividade de proteínas-RP, infere-se que seu modo de ação seja tanto direto, a partir dos resíduos do produto nas folhas, quanto pela elicitação de mecanismos bioquímicos de defesa. Para o ASM, a ausência de efeito sobre a germinação de esporos e comprimento do tubo germinativo, e o baixo efeito sobre o crescimento micelial, associado ao fato do produto ter elevado fortemente a atividade de proteínas-RP, é um indicativo que seu modo de ação seja apenas como indutor de resistência.

CONCLUSÕES

- Fosfito de potássio foi eficaz no controle da sarna da macieira quando aplicado preventivamente na concentração de $2 \mu\text{L.mL}^{-1}$;
- Os mecanismos de ação pelos quais o fosfito está atuando no controle da sarna da macieira não estão relacionados à atividade das proteínas-RP peroxidases e β -1,3 glucanases;
- O polissacarídeo quitosana e o ativador de defesas acibenzolar-S-metílico foram eficientes para o controle da cercosporiose da beterraba quando aplicados preventivamente a 1 mg.mL^{-1} e 50 mg.L^{-1} , respectivamente. Doses maiores desses produtos não promoveram aumento significativo no nível de controle da doença;
- Para o controle da cercosporiose, a quitosana atuou diretamente sobre o fungo (antibiose) e sobre a planta de beterraba (indução de resistência), enquanto o modo de ação do ASM se restringiu à ativação dos mecanismos de defesa vegetal.

REFERÊNCIAS

- ABCSEM - Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. **Pesquisa de mercado de sementes de hortaliças - ano calendário de 2007**. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/docs/pesquisa_mercado_2007.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2011.
- AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R.; TAMOGAMI, S.; YONEKURA, M.; KUBO, A.; SAJI, H. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.1061-1069, 2002.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**, 5ed. Amsterdam: Boston: ELSEVIER, 2005. 922p.
- AKUTSU, M.; TANAKA, H. **Controle químico da sarna da macieira**. EMPASC-EMBRAPA: Comunicado técnico nº 2, 1977. 5p.
- AVILA, Z.R.; PITELLI, R.A. Crescimento, esporulação e virulência do inóculo de *Cercospora piaropi*, agente de biocontrole do aguapé. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, 2004.
- AMIRI, A.; BOMPEIX, G. Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. **Crop Protection**, v.30, p.222-227, 2011.
- APG II. **Angiosperm Phylogeny Group**. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/>>. Acesso em: 12 jan. 2011.
- ARAÚJO, L.; STADNIK, M.J.; BORSATO, L.C.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.2, p.148-152, 2008.
- ASSIS, O.B.G.; LEONI, A.M.. Biofilmes comestíveis de quitosana: ação biofungicida sobre frutas fatiadas. **Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, n. 30, p.33-38, 2003.

BARBOSA, M.A.G.; LARANJEIRA, D.; COELHO, R.S.B. Custo fisiológico da resistência em algodoeiro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.4, p.338-342, 2008

BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3ª ed. Minneapolis. Burgess Publishing Company. 1972.

BENGTSSON, M.; WULFF, E.; JØRGENSEN, H.J.L.; PHAM, A.; LUBECK, M.; HOCKENHULL, J. Screening of organically based fungicides for apple scab (*Venturia inaequalis*) control and a histopathological study of the mode of action of a resistance inducer. **Pome Fruit Diseases**, v.29, n.1, p.123⁻¹²⁷, 2006.

BENGTSSON, M.; WULFF, E.; JØRGENSEN, H.J.L.; PHAM, A.; LUBECK, M.; HOCKENHULL, J. Comparative studies on the effects of a yucca extract and acibenzolar-S-methyl (ASM) on inhibition of *Venturia inaequalis* in apple leaves. **European Journal of Plant Pathology**, v.124, p.187-198, 2009.

BENHAMOU, N. Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. **Phytopathology**, v.82, p.1185⁻¹¹⁹³, 1992.

BENHAMOU, N.; BELANGER, R. R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Plant Journal**, v.14, p.13-21, 1998.

BEN-SHALOM, N.; ARDI, R.; PINTO, R.; AKI, C.; FALLIK, E. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. **Crop Protection**, v.22, p.285-290, 2003.

BERTON, O.; MELZER, R. Primeiras experiências no controle da sarna da macieira (*Ventura inaequalis*) com a tabela de Mills. **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Florianópolis, SC, v.17, p.867-877, 1983.

BERTON, O.; MELZER, R. Controle da sarna da macieira pelo sistema de Mills. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, p.1211⁻¹²¹⁷, 1984.

BLEICHER, J. História da macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. 743p.

BLUM, L.E.B.; AMARANTE, C.V.T.; DEZANET, A.; LIMA, E.B.; HACK NETO, P.; ÁVILA, R.D.; SIEGA, V. Fosfitos aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs 'Fuji' e 'Gala'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.2, 2007.

BOLWELL, G.P. Synthesis of cell wall components: aspects of control. **Phytochemistry**, v.27, p.1235-1253, 1988.

BONETI, J.I.S.; KATSURAYAMA, Y. **A sarna da macieira**. Florianópolis: EMPASC 1988. 39p. (Boletim Técnico, 44).

BONETI, J.I.S.; KATSURAYAMA, Y. Viabilidade do uso de fosfitos no manejo de doenças da macieira. In: **Encontro Nacional Sobre Fruticultura de Clima Temperado**, 5., 2002, Fraiburgo, SC. Anais. Cacador, SC: Epagri, 2002. p.125-139.

BONETI, J.I.; KATSURAYAMA, Y.; BLEICHER, J. Doenças da macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. 743p.

BONETI, J.I.S.; RIBEIRO, L.G.; KATSURAYAMA, Y. **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira**. Florianópolis, SC: EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia de SC, 1999. 149p.

BOAVA, L.P.; KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M.; FURTADO, E.L. Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*. **Tropical Plant Pathology**, v.35, p. 124-128, 2010.

BRADFORD, M.A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.

BRISSET M.N. et al. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.529-536, 2000.

BRUNELLI, Katia Regiane. ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. *Cercospora zea-maydis: esporulação, diversidade morfo-genética e reação de linhagens de milho*. Piracicaba, 2004. 105 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

BUTOLO, J.E. Uso de biomassa de levedura na alimentação animal: propriedades, custo relativo e outras fontes de nutrientes. In: WORKSHOP SOBRE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL. **Workshop**. Campinas: ITAL, 1996. p.70-89.

CAMARGO, L.S. **As hortaliças e seu cultivo**. Campinas: Fundação Cargill, 1981. 321p.

CAMILO, A.P.; DENARDI, F. Cultivares: descrição e comportamento no sul do Brasil. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. 743p.

CAMPBELL, M. A.; MEDDZ, R. W.; BROWN, J. F. Growth and sporulation of *Pyrenophora semeniperda* *in vitro*: effects of culture media, temperature and pH. **Mycol. Res.**, v.100, n.3, p.311-317, 1996.

CARUEL, T. **Nuovo giornale botanico Italiano**. Volume ottavo. Pisa, 1876.

CAMPESTRINI, Luciano Henrique. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia . *Aloe barbadensis* Miller: análise do perfil metabólico e estudos dos efeitos vasculogênicos e angiogênicos do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica (FP) e da acemanana. Florianópolis, SC, 2007. 1 v. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

CARSWELL, M.C.; GRANT, B.R.; THEODOROU, M.E.; HARRIS, J.; NIERE, J.O.; PLAXTON, W.C. The fungicide phosphonate disrupts the phosphate-starvation response in *Brassica nigra* seedlings. **Plant Physiology**, v.110, p.105–110, 1996.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, G.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

CHAN, Z.; TIAN, S. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. **Postharvest Biology and Technology**. v.36, p.215–223, 2005.

CRAVEIRO, A.A.; CRAVEIRO, A.C.; QUEIROZ, D.C. **Quitosana a Fibra do Futuro**. 2 ed. PADETEC: Fortaleza, 2004.

CNPUV - Embrapa uva e vinho. **Produção integrada de maçã**: grade de agroquímicos, ciclo 2010-2011. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/tecnologias/pim/>>. Acesso em 12 fev. 2011.

CROXALL, H.E; GWYNNE, D.C & JENKINS, J.E.E. The rapid assessment of apple scab on fruit. **Plant Pathology**, v.1, p.39-41, 1952.

CUERO, R.G.; OSUJI, G.; WASHINGTON, A. x³N-Carboxymethyl chitosan inhibition of A⁺atoxin production: role of zinc'. **Biotechnology Letters**, v.13, p.441-444, 1991.

DANIEL, R.; GUEST, D. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.67, p.194–201, 2006.

DANNER, M.A.; SASSO, S.A.Z.; MEDEIROS, J.G.S.; MARCHESE, J.A.; MAZARO, S.M. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.43, n.7, p.793-799, 2008.

DAUB, M.E.; EHRENSHAFT, M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual Review Phytopathology**, v.38, p.461-490, 2000.

DERCKX, W.; CREASY, L. L. Influence of fosetyl-Al on phytoalexin accumulation in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 34, p. 203-213, 1989.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**, CRC Press, Inc., 1985.

DIANESE, A.C.; BLUM, L.E.B.; DUTRA, J.B.; LOPES, L.F. Aplicação de fosfito de potássio, cálcio ou magnésio para a redução da podridão-do-pé do mamoeiro em casa de vegetação. **Ciencia Rural**, v.39, n.8, pp. 2309-2314, 2009.

DI PIERO, R.M. Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo-do-Sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e purificação parcial de compostos biologicamente ativos. **Tese de Doutorado**. Piracicaba SP. ESALQ, Universidade de São Paulo. 2003.

DI PIERO, R.M.; GARDA, M.V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.9, p.1121-1128, 2008.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J.; LAMB, C.J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.479-501, 1994.

DIXON R.A.; PAIVA N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v.7, p.1085-1097, 1995.

DOLAN, T. E.; COFFEY, M. D. Correlative *in vitro* and *in vivo* behavior of mutant strains of *Phytophthora palmivora* expressing different resistances to phosphorous acid and Fosetyl-Na. **Phytopathology**, v.78, p.974-978, 1988.

EL GHAOUTH, A.; ARUAL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, v.82, p.398-402, 1992.

EL GHAOUTH, A. et al. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. **Phytopathology**, v.84, n.3, p.313-320, 1994.

FANG, S.W.; LI, C.F.; SHIH, D.Y.C. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. **Journal of Food Protection**, v.57, n.2, p.136⁻¹⁴⁰, 1994.

FCI. **Farm chemical international**. Disponível em: <<http://www.farmchemicalsinternational.com/cropprotection/cpd/?op=cpdproductdetail&pid=22020>>. Acesso em: 04 fev. 2011.

FELIPINI, R.B.; DI PIERO, R.M. Redução da severidade da podridão-amarga de maçã em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.12, 2009.

FEMENIAA, A.; PASCUALB, P.G.; SIMALA, S.; ROSSELLO, C. Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p.397-405, 2003.

FIALHO, Maurício Batista. ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIRÓZ. **Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guinardia citricarpa* agente causal da pinta preta dos citros**. Piracicaba, SP, 2004. 1 v. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2.ed. rev. e ampl. Viçosa: Ed. UFV, 2003. 412p.

FÖRSTER, H.; ADASKAVEG, J.E.; KIM, D.H.; STANGHELLINI, M.E. Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. **Plant Disease**, v.82, n.10, 1998.

GASPAR, T.H., PENEL, C.L., THORPE, T., GREPPIN, H.. **Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants**. Genève, Université de Genève, Centre de Botanique, 1982. 313p.

GAY, P.A.; TUZUN, S. Involvement of a novel peroxidase isozyme and lignification in hydathodes in resistance to black rot in cabbage. **Canadian Journal of Botany**, v.78, p.1144-1149, 2000.

GILPATRICK, J. D.; SZKOLNIK, M.; GIBBS, S. D. A single, high rate application of difolatan for the control of apple scab. (Abstr.) **Phytopathology**, v.61, p.893, 1971.

GOODWIN, S.B., DUNKLE, L.D. AND ZISMANN, V.L. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Phytopathology**, v.91, p.648-658, 2001.

GOTTSTEIN, H.; KUC, J. The induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. **Phytopathology**, 79, p.176-179, 1989.

GOUDET, C.; MILAT, M.L.; SENTENAC, H.; THIBAUD, J.B. Beticolins, nonpeptidic, polycyclic molecules produced by the phytopathogenic fungus *Cercospora beticola*, as a new family of ion channel-forming toxins. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v.13, p.203-209, 2000.

GUIMARÃES, V.F.; ECHER, M.M.; MINAMI, K. Métodos de produção de mudas, distribuição de matéria-seca e produtividade de plantas de beterraba. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.3, 2002.

GULEN, H.; ERIS, A. Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. **Plant Science**, v.166, n.3, p.739-744.

HALLER, J.S. A drug for all seasons, medical and pharmacological history of aloe. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v.66, p.647-659, 1990.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.73-82, 1982.

HARKIN, J.M., OBST, J.R. Lignification in trees: indication of exclusive peroxidases participation. **Science**, v.180, p.296-298, 1973.

HAY, J.E.; HAYNES, L.J. The aloins - Part I. The structure of barbaloin. **Journal of Chemistry Society**, v.25, p.3141-3147, 1956.

HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. Pathometry: the measurement of plant disease. In: Horsfall, J.G. & Cowling, E.B. (Eds.) **Plant disease an advanced treatise**. How disease develops in populations. New York. Academic Press. 1978. pp.119⁻136.

HRAZDINA, G. Response of scab-susceptible (McIntosh) and scab-resistant (Liberty) apple tissues to treatment with yeast extract and *Venturia inaequalis*. **Phytochemistry**, v.64, p.485-492, 2003.

ICEPA. **Instituto CEPA**. Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br/>>. Acesso em: 12 fev. 2011.

IOANNIDIS, P.M.; KARAOGLANIDIS, G.S. Resistance of *Cercospora beticola* Sacc. to fungicides. **Sugar Beet Research**, v.2, p.123-147, 2000.

IPPOLITO, A.; EL GHOUTH, A.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. **Postharvest Biology and Technology**, v.19, p.265-272, 2000.

ISAAC, S. **Fungal and plant interactions**. London: Chapman and Hall, 1992. 418p.

ISHIDA, A.K.N.; SOUZA, R.M.; CAVALCANTI, F.R.; OLIVEIRA, D.L.; POZZA, E.A. Rhizobacterium and acibenzolar-S-methyl (ASM) in resistance induction against bacterial blight and expression of defense responses in cotton. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, 2008.

ISLA. **Beterraba Maravilha**. Disponível em: <<http://isla.com.br/cgi-bin/detalhe.cgi?id=67>>. Acesso em: 03 fev. 2011.

IUCHI, M.V. Botânica e fisiologia. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. 743p.

JIA, Y.; ZHAO, G.; JIA, J. Preliminary evaluation: The effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, n.2, p.181-189, 2008.

JONES, D. H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, an its role in plant development. **Phytochemistry**, v.23, p.1349-1359, 1984.

KATSURAYAMA, Y. & BONETI, J. I. da S. Redução da sensibilidade da população de *Venturia inaequalis* aos fungicidas fenarimol e dodine, provocada pelas pulverizações sucessivas no campo. **Fitopatologia brasileira**, v.22, p.273. 1997 (Resumo, 237).

KAUSS, H.; JEBLICK, W.; DOMARD, A. The degree of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Cathalanthus roseus*. **Planta**, v.178, p.385-392, 1989.

KEITH, G.W. Some relations of environment to the epidemiology and control of apple scab. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.12, 1926.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2008. 431p.

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ,B.; SMITH, D.L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.859-863, 2003.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v.24, p.2339-2349, 2003.

KIRKHAM, D.S. The significance of polyphenolic metabolites of apple and pear in the host relation of *Venturia inaequalis* and *Venturia pirina*. **Journal of General Microbiology**, v.17, p.491–504, 1957.

LANDSCHOOT, P., COOK, J. **Understanding the Phosphonate Products**. Department of Crop and Soil Sciences, The Pennsylvania State University, University Park, PA, 2005. Disponível em: <http://turfgrassmanagement.psu.edu/pdf/understanding_the_phosphonate_products.pdf>. Acesso em: 8 mar. 2011.

LATUNDE-DADA, A.O.; LUCAS, J.A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.58, n.5, p.199-208, 2001.

LESER, C.; TREUTTER, D. Effect of nitrogen supply on growth content of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. **Physiol Plant**, v.123, p.49-56, 2005.

LEVER, M.A. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v.47, p.273-279, 1972.

LEWELLEN, R.T.; WHITNEY, E.D. Inheritance of resistance to race C2 of *Cercospora beticola* in sugarbeet. **Crop Science**, 16, 558–561, 1976.

LI, B.; XU, X. Infection and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) on old leaves. **Journal of Phytopathology**, v.150, p.687–691, 2002.

LIN, W.; HUA, X.; ZHANG, B. W.; ROGERS, W. J.; CAI, W. Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.937–944, 2005.

LIU, L.; TIAN, S.; MENG, X. G.; XU, Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruits. **Postharvest biology and technology**, v.44, p.300-306, 2007.

MACHARDY, W.E. **Apple scab: biology, epidemiology and management**. Saint Paul MN, APS Press, 1996.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 7 mar. 2011.

MCDONALD, A.E.; GRANT, B.R.; PLAXTON, W.C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture, and influence on the plant phosphate starvation response. **Journal of Plant Nutrition**, v.24, p.1505–1519, 2001.

MACINTIRE, W. H., WINTERBERG, S. H., HARDIN, L. J., STERGES, A. J., CLEMENTS, L. B. Fertilizer evaluation of certain phosphorus, phosphorous, and phosphoric materials by means of pot cultures. **Agronomy Journal**, v.42, p.543–549, 1950.

MAXSON-STEIN, K.; HE, S.; HAMMERSCHMIDT, R.; JONES, A.L. Effect of treating apple trees with acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis-related protein genes. **Plant Disease**, v.86, n.7, p.785-790, 2002.

MAZARO, S.M.; WAGNER JÚNIOR, A.; SANTOS, I.; CITADIN, I.; POSSENTI, J.C.; GOUVÊA, A. Controle do tombamento de plântulas de beterraba e tomate pelo tratamento de sementes com quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.11, p.1424¹430, 2009.

MCCUE, P. et al. A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. **Biochemistry**, v. 35, p. 603–613, 2000.

MDIC. **Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior**. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=2&menu=999>>. Acesso em: 21 jan. 2011.

MELZER, R.; BERTON, O. **Sistema de alerta para o controle da sarna da macieira**. Florianópolis: EMPASC, 1989. 75p.

METCALF, W. W., WOLFE, R. S. Molecular genetic analysis of phosphite and hypophosphite oxidation by *Pseudomonas stutzeri* WM88. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.5547–5558, 1998.

MIKULIC PETKOVSEK, M.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R. Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.74, p.60-67, 2009.

MILLS, W.D. Efficient use of sulfur dusts and sprays during raining to control apple scab. **Cornell Ex. Bull.**, n.630, p.1-4, 1944.

MORIMOTO, F. **A oportunidade de renda e empregos com beterraba**. Londrina: Emater, 1999.

NACHTIGALL, G. R. **Maçã: produção**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. 171p.

NICHOLSON, R.L., VAN SCOYOC, S., WILLIAMS, E.B., KUC, J., Host-pathogen interactions preceding the hypersensitive reaction of *Malus* sp. to *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, v.67, p.108–114, 1977.

NILSON, T. The pigment content in beetroots with regard to cultivar, growth, development and growing conditions. **Swedish Journal agricultural Research**, v. 3, n. 4, p. 187-200, 1973.

NO, H.K.; MEYERS, S.P. **Preparation of chitin and chitosan**. Chitin Handbook: European chitin society, p.475-489, 1997.

NOJOSA, G.B. de A.; RESENDE, M.L.; RESENDE, A.V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, G.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

NOJOSA, G.B.A.; RESENDE, M.L.V., BARGUIL, B.M.; MORAES, S.R.G.; VILAS BOAS, C.H. Effect of resistance inducers on coffee against *Phoma* leaf spot. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.1, p.60-62, 2009.

NRSC/USDA. **National Resource Service Conservation**. Disponível em: <<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=BEVU2>>. Acesso em: 21 fev. 2011.

NUNES, A. J. P. O cultivo de camarões marinhos no nordeste do Brasil. **Panorama da Aquicultura**, v. 11, p. 29-33, 2001.

OBWALD, W.F., ELSTNER, E.F. Die Wirt-parasit-interaktionen: bakterien und pilze als parasiten. In: HOCK, B.; ELSTNER, E.F. (editors). **Schadwirkungen auf Pflanzen**. Wien: Bibliographisches Institut, p. 241-282, 1988.

OSÓRIO, A.O. Comercialização de produtos hortifrutigranjeiros na Ceasa/SC - Unidade de São José. In: EPAGRI. **Síntese Anual da Agricultura Catarinense 2009-2010**. Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br/>>. Acesso em: 12 jan. 2011.

OUMETTE, D.G.; COFFEY, M.D. Phosphonate levels in avocado (*Persea americana*) seedlings and soil following treatment with fosetyl-Al or potassium phosphonate. **Plant Disease**, v.73, p.212-215, 1989.

PAL, V.; MUKHOPADHYAY, A.N. Study of the cellulolytic and pectolytic enzymes in nine biological forms of *Cercospora beticola* Sacc. **Acta Phytopathology Academy Science**. Hung. 19, 263-269, 1984.

PARISI, L., DUREL, C.E., LAURENS, F. First report on the presence of *Venturia inaequalis* race 7 in french apple orchards. In: PARISI, L. (Ed.), **Integrated Control of Pome Fruit Diseases**. IOBC/WPRS, Gent, Belgium, p.99-104, 2000.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO A, KIMATI H, AMORIM L (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo, Ceres, p. 417-452, 1995.

PERCIVAL, G.C.; NOVISS, K.; HAYNES, I. Field evaluation of systemic inducing resistance chemicals at different growth stages for the

control of apple (*Venturia inaequalis*) and pear (*Venturia pirina*) scab. **Crop Protection**, v.28, p.629-633, 2009.

PICCININ, E.; DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.5-9, 2005.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **TRENDS in Biotechnology**, v.21, p.400-407, 2003.

RAJTEN, A.M.; GERENDÁS, J. A critical assessment of the suitability of phosphite as a source of phosphorus. **J. Plant Nutr. Soil Sci.** v.172, p.821-828, 2009.

REBOLLAR-ALVITER, A.; WILSON, L.L.; MADDEN, L.V.; ELLIS, M.A. A comparative evaluation of post-infection efficacy of mefenoxam and potassium phosphite with protectant efficacy of azoxystrobin and potassium phosphite for controlling leather rot of strawberry caused by *Phytophthora cactorum*. **Crop Protection**, v.29, p.349-353, 2010.

REDDY, M.V.B.; ARUL, J.; ANGERS, P.; COUTURE, L. Chitosan Treatment of Wheat Seeds Induces Resistance to *Fusarium graminearum* and Improves Seed Quality. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.47, n.3, 1999.

RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L. & CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.123-130, 2003.

RESENDE, M.L.V., COSTA, J.C.B., CAVALCANTI, F.R., RIBEIRO JÚNIOR, P.M. & CAMILO, F.R. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.213-221, 2007.

REUVENI, R.; DOR, G.; REUVENI, M. Local and systemic control of powdery mildew (*Leveillula taurica*) on pepper plants by foliar spray of mono-potassium phosphate. **Crop Protection**, v.17, n.9, p.703-09, 1998.

RIBEIRO, P.M.J.; RESENDE, M.L.V.; PEREIRA, R.B.; CAVALCANTI, F.R.; AMARAL, D.R.; PÁDUA, M.A. Fosfito de potássio na indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb., em mudas de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). **Ciência Agrotecécnica**, v. 30, n. 4, p.629-636, 2006.

RODRIGUEZ, JD.; HERNANDEZ-CASTILLO, D.; RODRIGUEZ-GARCIA, R.; ANGULO-SANCHEZ, J.L. Antifungal activity in vitro of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**. v.21, p.81-87, 2005.

RODRIGUES, A.A.C.; BEZERRA NETO, E. & COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.492-499, 2006.

RONCATTO, M.C.; PASCHOLATI, S.F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). **Scientia Agricola**, v.55, p.395-402, 1998.

ROSS, A.F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. **Virology**, v.14, p.340–58, 1961.

SAKS, Y.; BARKAI-GOLAN, R. *Aloe vera* gel activity against plant pathogenic fungi. **Postharvest Biology and Technology**, v.6, p.159⁻¹65, 1995.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. rev. Florianópolis, SC: Editora da UFSC, 2001.

SANTOS, J.E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E.R.; FILHO, S.P.C.; CAVALHEIRO, E.T.G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v.13, n.4, 2003.

SATHIYABAMA, M.; BALASUBRAMANIAN, F.L. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg.. **Crop Protection**, v.17, n.4, 1998.

SCHENATO, P.G.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; DUARTE, V. Determinação da presença da raça 1 de *Venturia inaequalis* no sul do Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.4, p.281-287, 2008.

SHANNER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, v.67, p.1051⁻¹056, 1977

SIEGRIST, J.; MÜHLENBECK, S.; BUCHENAUER, H. Cultured parsley cells, a model system for the rapid testing of abiotic and natural substances as inducers of systemic acquired resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.53, p.223-238, 1998.

SILVA, S.R.; PASCHOLATI, S.F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.99, n.2, p.159⁻¹67, 1992.

SILVA, O.C.; SANTOS, H.A.A.; DALLA PRIA, M.; MAY-DE MIO, L.L. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. **Crop Protection**, 1-7, 2011.

SILVA JÚNIOR, A. **Essentia herba** – Plantas bioativas. Florianópolis: EPAGRI, v.1, p.120⁻¹48, 2003. 441p.

SIVANSEN, A. **The taxonomy and pathology of *Venturia* species**. Vaduz, Liechestein: Bibliotheca Mycologica, 1977.

SMILLIE, R.; GRANT, B.R.; GUEST, G. The mode of action of phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. **Disease Control and Pest Management**, v.79, n.9, 1989.

SMITH, G.A. Sugar beet. In: **Principles of cultivar development: Crop Species** (Fehr, W.R., ed.). New York: Macmillan, pp. 577–625, 1987.

SOBRINHO, C.A.; FERREIRA, P. de T. de O.; CAVALCANTI, L.S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L.S. et. al. In: **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

SOUZA, R.R.S. **Caracterização anatômica quantitativa e composição de óleos essenciais em três estágios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. . **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa (SP): Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005. 640 p.

STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H. Accumulation of autofluorogenic compounds at the penetration site of *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* is associated with both benzothiadiazole-induced and quantitative resistance in wheat. **Journal of Phytopathology**, v.147, p.615-622, 1999.

STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppress the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.57, p.25-34, 2000.

STADNIK, M.J.; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: STADNIK, M.J.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004.

STANGARLIN, J.R., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., CRUZ, M.E.S. & NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.11, p.16-21, 1999.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, v.20, p.16-21, 1994.

STEINKAMP, M.P.; MARTIN, S.S.; HOEFERT, L.L. RUPPEL, E.G.

Ultrastructure of lesions produced by *Cercospora beticola* in leaves of *Beta vulgaris*. **Physiol. Plant Path.** v.15, p.13–26, 1979.

STEINER, U; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. **Induced resistance to disease in plants**. Kluwer Academic Pub., Dordrech. 1995. 182p.

STICHER, L.; MAUCHI-MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.235-270, 1997.

SUDHARSHAN, N.R.; HOOVER, D.G.; KNORR, D. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnology**, v.6, p.257-272, 1992.

SBREB. **Sugarbeet research & education board**. Disponível em: <<http://www.sbreb.org/>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

TANADA-PALMU, P.S.; PROENÇA, P.S.P.; TRANI, P.E.; PASSOS, F.A.; GROSSO, C.R.F. Recobrimento de sementes de brócolos e salsa com coberturas e filmes biodegradáveis. **Bragantia**, v.64, n.2, P.291-297, 2005.

THAO, H.T.B.; YAMAKAWA, T. Phosphite (phosphorous acid): fungicide, fertilizer or bio-stimulator? **Soil Science & Plant Nutrition** v.55, n.2, p.228–234, 2009.

TOWNSEND, G.R. & HEUBERGER, J.W. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. **The Plant Disease Reporter**, v.27, p.340-343, 1943.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. & BETTI, J.A. Doenças da Macieira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p. 422-433, 2005.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; OLIVEIRA, P.R.D. Resgate de macieiras antigas no Rio Grande do Sul: uma opção para a manutenção da diversidade genética. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.1, p.158⁻¹59, 2006.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. Quantificação de doenças. **Quant v.1.0.1**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

VANDER, P.; VÅRUM, K.M.; DOMARD, A.; EL GUEDDARI, N.E.; MOERSCHBACHER, B.M. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. **Plant Physiol.**, v.118, p.1353–1359, 1998.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453–483, 1998.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135¹62, 2006.

VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.2, p.087-096, 2009.

VIEIRA, L.M. Desempenho da produção vegetal: maçã. In: **Síntese da agricultura catarinense 2009-2010**. Florianópolis: EPAGRI, 2010.

WALLER, G. R.; MANGIAFICO, S.; RITCHEY, C. R. Chemical investigation of *Aloe barbadensis* Miller. **Proc. Okla. Acad. Sci.** v.58, p. 69-76, 1978.

WEILAND, J.; KOCH, G. Sugarbeet leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.). **Molecular Plant Pathology**, v.5, n.3, p.157–166, 2004.

WEILAND, J.J.; HALLOIN, J.M. Benzimidazole resistance in *Cercospora beticola* sampled from sugarbeet fields in Michigan, USA. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.23, p.78–82, 2001.

WHO. World Health Organization. **Monographs on selected medicinal plants**. v.1. WHO: Geneva, 1999.

WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.425-441, 1989.

WOISKY, R.G.R.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v.37, p.99⁻¹05, 1998.

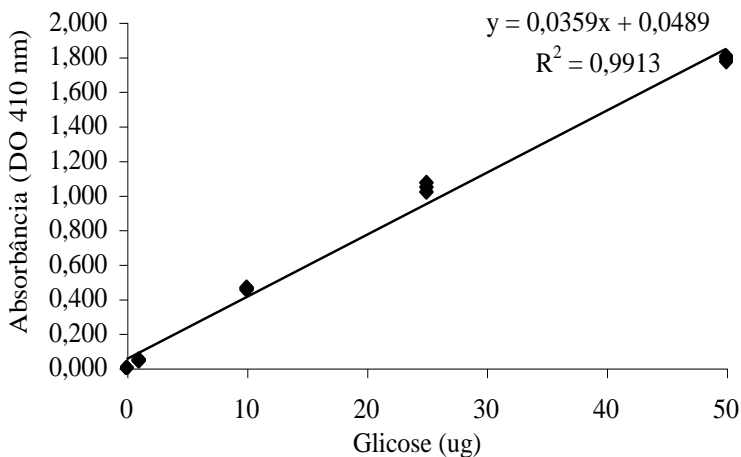
WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Praparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agricola**, v.55, n.1, 1998.

YOSHIMURA, K.; YABUTA, Y.; ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. **Plant Physiology**, v.123, p.223-233, 2000.

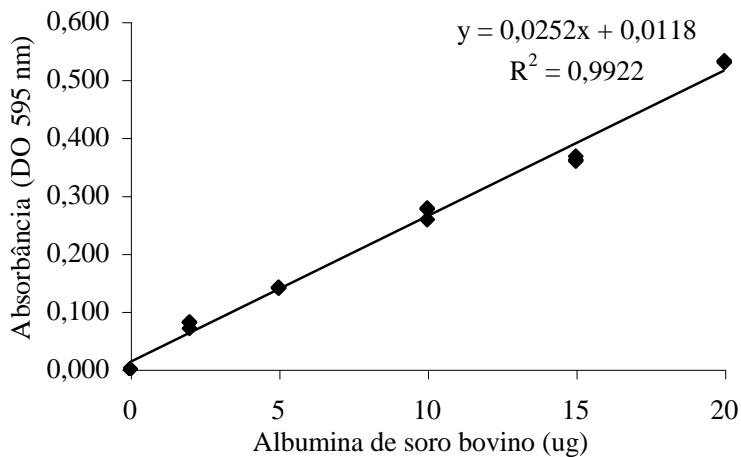
ZHAO, S.; SHAMOUN, S.F. The effects of culture media, solid substrates, and relative humidity on growth, sporulation and conidial discharge of *Valdensinia heterodoxa*. **Mycological Research**, v.110, n.11, p.1340⁻¹346, 2006.

APÊNDICES

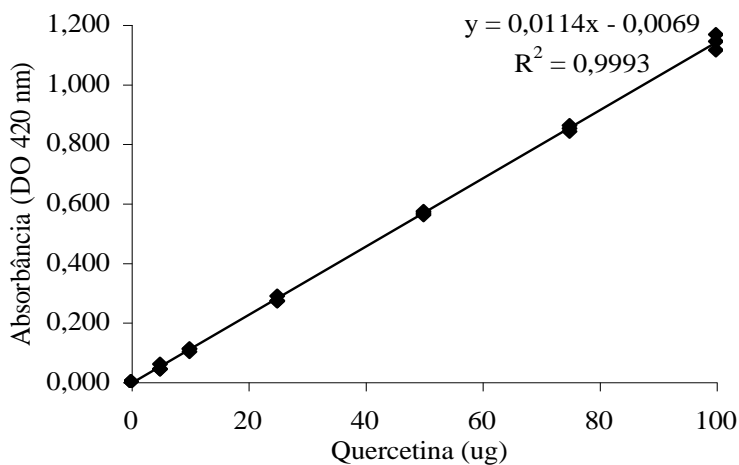
Apêndice 1. Curva-padrão para a quantificação de açúcares redutores totais pelo método de Lever.



Apêndice 2. Curva-padrão para a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford.



Apêndice 3. Curva-padrão para a quantificação de flavonóides.



Apêndice 4. Curva-padrão para a quantificação de compostos fenólicos totais.

